

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392790** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.01.15

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.06

(54) **АНТИТЕЛА К CD19 И CAR-T-КЛЕТОЧНЫЕ СТРУКТУРЫ**

(31) **63/171,520; 63/311,913**

(72) Изобретатель:

(32) **2021.04.06; 2022.02.18**

**Тринклейн Натан, Харрис Кэтрин,
Аванцино Брайан, Чанг Карен,
Дэвисон Лаура, Мэдисон Блэр Б.,
Лукас Джозеф С. (US)**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/023723**

(87) **WO 2022/216864 2022.10.13**

(71) Заявитель:

(74) Представитель:

ТЕНЕОБИО, ИНК. (US)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Раскрыты антитела к CD19 (например, UniAbs™) и CAR-T-клеточные структуры, наряду со способами получения таких антител и CAR-T-клеточных структур, композициями, в том числе фармацевтическими композициями, содержащими такие антитела и CAR-T-клеточные структуры, и их применением для лечения нарушений, которые характеризуются экспрессией CD19.

Столбец 1	Столбец 2	Столбец 3
ID клона	Клетки Raji	Нецелевые CHO
370083	120,5	1,0
370034	80,3	1,0

A1

202392790

202392790

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579303EA/022

АНТИТЕЛА К CD19 И CAR-T-КЛЕТОЧНЫЕ СТРУКТУРЫ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета даты подачи предварительной заявки на патент США с регистрационным № 63/171520, поданной 6 апреля 2021 г., раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Настоящая заявка также испрашивает преимущество приоритета даты подачи предварительной заявки на патент США с регистрационным № 63/311913, поданной 18 февраля 2022 г., раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[2] Настоящее изобретение относится к антителам (например, UniAbsTM) и CAR-T-клеточным структурам, которые связываются с CD19. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам получения таких антител и CAR-T-клеточных структур, композициям, в том числе фармацевтическим композициям, содержащим такие антитела и CAR-T-клеточные структуры, и их применению для лечения нарушений, которые характеризуются экспрессией CD19.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Кластер дифференцировки 19 (CD19)

[3] CD19, также известный как В-лимфоцитарный поверхностный антиген В4 (UniProt P15391), представляет собой рецептор клеточной поверхности, экспрессирующийся на всех В-клетках человека, но не на плазматических клетках. CD19 представляет собой трансмембранный белок, привлекающий цитоплазматические сигнальные белки к мембране, и он функционирует в составе комплекса CD19/CD21, уменьшая порог активации сигнальных путей В-клеточных рецепторов. CD19 имеет относительно большой цитоплазматический "хвост" из 240 аминокислот. Внеклеточные Ig-подобные домены разделены потенциально стабилизированным дисульфидными связями не-Ig-подобным доменом и сайтами N-связанного присоединения углеводов. Цитоплазматический "хвост" содержит по меньшей мере девять остатков тирозина вблизи С-конца, некоторые из которых, как было показано, являются фосфорилированными. Наряду с CD20 и CD22, экспрессия CD19, ограниченная В-клеточной линией дифференцировки, делает его привлекательной мишенью для терапевтического лечения В-клеточных злокачественных опухолей. Было описано множество моноклональных антител и конъюгатов антитело-лекарственное средство, специфичных в отношении CD19 (Naddafi et al. 2015, PMC4644525). Кроме того, Т-клетки с химерным антигенным рецептором, связывающимся с CD19, были одобрены для лечения лейкоза (Sadelain et al. 2017, PMID: 29245005).

Антитела на основе тяжелых цепей

[4] В обычном антителе, представляющем собой IgG, ассоциация тяжелой цепи и

легкой цепи частично обусловлена гидрофобным взаимодействием между константной областью легкой цепи и константным доменом CH1 тяжелой цепи. Существуют дополнительные остатки в каркасной области 2 (FR2) и каркасной области 4 (FR4) тяжелой цепи, которые также способствуют этому гидрофобному взаимодействию между тяжелой и легкой цепями.

[5] Однако известно, что сыворотка крови верблюдовых (подотряд Tylopoda, который включает верблюдов, дромедаров и лам) содержит основной тип антител, состоящих исключительно из парных H-цепей (антитела, содержащие только тяжелые цепи, или UniAbsTM). UniAbsTM Camelidae (*Camelus dromedarius*, *Camelus bactrianus*, *Lama glama*, *Lama guanaco*, *Lama alpaca* и *Lama vicugna*) характеризуются уникальной структурой, состоящей из единственного переменного домена (VHH), шарнирной области и двух константных доменов (CH2 и CH3), которые являются высокомолекулярными доменами CH2 и CH3 классических антител. Данные UniAbsTM характеризуются отсутствием первого домена константной области (CH1), который присутствует в геноме, но подвергается сплайсингу во время процессинга мРНК. Отсутствие домена CH1 объясняет отсутствие легкой цепи в UniAbsTM, так как этот домен представляет собой место закрепления константного домена легкой цепи. Такие UniAbsTM естественным образом эволюционировали так, чтобы придать антигенсвязывающую специфичность и высокую аффинность посредством трех CDR от обычных антител или их фрагментов (Muyldermans, 2001; *J Biotechnol* 74:277-302; Revets et al., 2005; *Expert Opin Biol Ther* 5:111-124). Хрящевые рыбы, такие как акулы, также выработали особый тип иммуноглобулина, обозначаемый как IgNAR, который характеризуется отсутствием легких полипептидных цепей и полностью состоит из тяжелых цепей. Молекулы IgNAR можно подвергать манипуляциям посредством молекулярной инженерии для получения переменного домена единственного полипептида тяжелой цепи (vNAR) (Nuttall et al. *Eur. J. Biochem.* 270, 3543-3554 (2003); Nuttall et al. *Function and Bioinformatics* 55, 187-197 (2004); Dooley et al., *Molecular Immunology* 40, 25-33 (2003)).

[6] Способность антител, содержащих только тяжелые цепи и не содержащих легкую цепь, связывать антиген была установлена в 1960-х гг. (Jaton et al. (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195). Тяжелая цепь иммуноглобулина, физически отделенная от легкой цепи, сохраняла 80% антигенсвязывающей активности по сравнению с тетрамерным антителом. Sitia et al. (1990) *Cell*, 60, 781-790 продемонстрировали, что удаление домена CH1 из реаранжированного мышинового гена μ приводит к продуцированию антитела, содержащего только тяжелые цепи и не содержащего легкую цепь, в культуре клеток млекопитающего. Продуцируемые антитела сохраняли специфичность связывания VH и эффекторные функции.

[7] Антитела на основе тяжелых цепей с высокой специфичностью и аффинностью могут быть получены к различным антигенам посредством иммунизации (van der Linden, R.H., et al. *Biochim. Biophys. Acta.* 1431, 37-46 (1999)), и часть VHH можно легко

клонировать и экспрессировать в дрожжах (Frenken, L. G. J., *et al. J. Biotechnol.* 78, 11-21 (2000)). Их уровни экспрессии, растворимости и стабильности значительно выше, чем у классических фрагментов F(ab) или Fv (Ghahroudi, M.A. *et al. FEBS Lett.* 414, 521-526 (1997)).

[8] Мыши, у которых локус легкой (L) цепи λ (лямбда) и/или локусы L-цепей λ и κ (каппа) были функционально подвергнуты сайленсингу, и антитела, продуцируемые такими мышами, описаны в патентах США №№ 7541513 и 8367888. О рекомбинантном продуцировании антител, содержащих только тяжелые цепи, у мышей и крыс сообщалось, например, в WO 2006008548; публикации заявки на патент США № 20100122358; Nguyen *et al.*, 2003, *Immunology*; 109(1), 93-101; Brüggemann *et al.*, *Crit. Rev. Immunol.*; 2006, 26(5):377-90; и Zou *et al.*, 2007, *J Exp Med*; 204(13): 3271-3283. Получение крыс, характеризующихся нокаутом, посредством микроинъекций нуклеаз с цинковыми пальцами в эмбрион описано в Geurts *et al.*, 2009, *Science*, 325(5939):433. Растворимые антитела, содержащие только тяжелые цепи, и трансгенные грызуны, содержащие гетерологичный локус тяжелых цепей, продуцирующие такие антитела, описаны в патентах США №№ 8883150 и 9365655. CAR-T-клеточные структуры, содержащие однодоменные антитела в качестве связывающих (нацеливающих) доменов, описаны, например, в Iri-Sofla *et al.*, 2011, *Experimental Cell Research* 317:2630-2641, и Jamnani *et al.*, 2014, *Biochim Biophys Acta*, 1840:378-386.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[9] Аспекты настоящего изобретения включают антитела, которые связываются с CD19, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: (a) последовательность CDR1, имеющую две или менее замены в SEQ ID NO: 1, и/или (b) последовательность CDR2, имеющую две или менее замены в SEQ ID NO: 2; и/или (c) последовательность CDR3, имеющую две или менее замены в любой из SEQ ID NO: 3-4.

[10] В некоторых вариантах осуществления последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 присутствуют в каркасной области человеческой VH. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит последовательность константной области тяжелой цепи в отсутствие последовательности CH1.

[11] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (a) последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 38; и/или (b) последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 39; и/или (c) последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (a) последовательность CDR1, содержащую SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 38; и (b) последовательность CDR2, содержащую SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 39; и (c) последовательность CDR3, содержащую SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (a) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3; или (b) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO:

2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4; или (c) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 38, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3; или (d) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 38, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4; или (e) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 39 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3; или (f) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 39 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4.

[12] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с любой из последовательностей под SEQ ID NO: 5, 6, 40 и 41. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность переменной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 40 и 41. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 41.

[13] Аспекты настоящего изобретения включают антитела, которые связываются с CD19, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в каркасной области человеческой VH, где последовательности CDR представляют собой последовательности, имеющие две или менее замены в последовательности CDR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 38 и 39. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в каркасной области человеческой VH, где последовательности CDR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 38 и 39.

[14] Аспекты настоящего изобретения включают антитела, которые связываются с CD19, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3 в каркасной области человеческой VH; или (b) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4 в каркасной области человеческой VH; или (c) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 38, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3 в каркасной области человеческой VH; или (d) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 38, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4 в каркасной области человеческой VH; или (e) последовательность CDR1

под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 39 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3 в каркасной области человеческой VH; или (f) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 39 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4 в каркасной области человеческой VH.

[15] В некоторых вариантах осуществления антитело является полиспецифическим. В некоторых вариантах осуществления антитело является биспецифическим. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с двумя разными белками CD19. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с двумя разными эпитопами на одном и том же белке CD19. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с Т-клеточным антигеном. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с CD3. В некоторых вариантах осуществления антитело представлено в формате CAR-T.

[16] Аспекты настоящего изобретения включают CAR-T-клетки, содержащие CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую: (a) последовательность CDR1, содержащую SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 38; и (b) последовательность CDR2, содержащую SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 39; и (c) последовательность CDR3, содержащую SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

[17] В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит (a) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3 в каркасной области человеческой VH; или (b) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4 в каркасной области человеческой VH; или (c) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 38, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3 в каркасной области человеческой VH; или (d) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 38, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4 в каркасной области человеческой VH; или (e) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 39 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3 в каркасной области человеческой VH; или (f) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 39 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4 в каркасной области человеческой VH.

[18] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, содержит переменную область тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с любой из последовательностей под SEQ ID NO: 5, 6, 40 и 41. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, содержит последовательность переменной области тяжелой цепи, выбранную из группы,

состоящей из SEQ ID NO: 5-6. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 5, 6, 40 и 41. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 41.

[19] Аспекты настоящего изобретения включают фармацевтические композиции, содержащие антитело или CAR-T-клетку, описанные в данном документе.

[20] Аспекты настоящего изобретения включают способы лечения В-клеточного нарушения, характеризующегося экспрессией CD19, включающие введение субъекту с указанным нарушением антитела, CAR-T-клетки или фармацевтической композиции, описанных в данном документе.

[21] В некоторых вариантах осуществления нарушение представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL). В некоторых вариантах осуществления нарушение представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ALL). В некоторых вариантах осуществления нарушение представляет собой неходжкинскую лимфому (NHL). В некоторых вариантах осуществления нарушение представляет собой системную красную волчанку (SLE). В некоторых вариантах осуществления нарушение представляет собой ревматоидный артрит (RA). В некоторых вариантах осуществления нарушение представляет собой рассеянный склероз (MS).

[22] Аспекты настоящего изобретения включают полинуклеотиды, кодирующие антитело или CAR в CAR-T-клетке, описанной в данном документе, векторы, содержащие такие полинуклеотиды, и клетки, содержащие такие векторы.

[23] Аспекты настоящего изобретения включают способы получения антитела, описанного в данном документе, при этом способы включают выращивание клетки, описанной в данном документе, в условиях, допускающих экспрессию антитела, и выделение антитела из клетки и/или среды для культивирования клеток, в которой выращивают клетку.

[24] Аспекты настоящего изобретения включают способы получения антитела, описанного в данном документе, при этом способы включают иммунизацию животного UniRat с помощью CD19 и идентификацию CD19-связывающих последовательностей тяжелых цепей.

[25] Аспекты настоящего изобретения включают способы лечения, включающие введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективной дозы антитела, CAR-T-клетки или фармацевтической композиции, описанных в данном документе.

[26] Аспекты настоящего изобретения включают применение антитела или CAR-T-

клетки, описанных в данном документе, в получении лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом.

[27] Аспекты настоящего изобретения включают наборы для лечения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом, содержащие антитело, CAR-T-клетку или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, и инструкции по применению. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный реагент. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один дополнительный реагент содержит химиотерапевтическое лекарственное средство.

[28] Эти и другие аспекты будут дополнительно объяснены в остальной части настоящего раскрытия, в том числе примерах.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[29] На фиг. 1 показана таблица, в которой обобщены данные о связывании CD19 для указанных конструкций на основе антител в отношении CD19+ клеток Raji и клеток отрицательного контроля.

[30] На фиг. 2, панелях А и В, представлены графики, на которых показано связывание с клетками в зависимости от концентрации антитела для указанных конструкций на основе антител в указанных типах клеток (Raji и Daudi).

[31] На фиг. 3 показана таблица, в которой обобщены значения EC50 для связывания с клетками указанных конструкций на основе антител в CD19+ клетках Raji и Daudi.

[32] На фиг. 4, панели А, показано схематическое изображение CAR-T-клеточной структуры, содержащей внеклеточный связывающий домен для CD19.

[33] На фиг. 4, панелях В и С, представлены графики, на которых показаны антигенспецифическое связывание и активация конструкций CAR, содержащих внеклеточные связывающие домены для CD19, тестируемых в указанных линиях клеток.

[34] На фиг. 5, панелях А и В, представлены графики, на которых показаны сравнительные результаты исследования цитотоксичности для Т-клеток, экспрессирующих CAR, содержащий связывающее средство VH T29D либо связывающее средство VH S55D, по сравнению с исходным связывающим средством VH-034.

[35] На фиг. 6 показана таблица, в которой обобщена улучшенная активация Т-клеток *in vitro* в Т-клетках, экспрессирующих CAR, содержащий связывающее средство VH T29D либо связывающее средство VH S55D, по сравнению с исходным связывающим средством VH-034.

[36] На фиг. 7 представлена таблица, в которой показано, что обогащенные связывающие средства VH для CD19 в формате CAR обеспечивают более высокие уровни экспрессии CAR в Т-клетках по сравнению с исходным связывающим средством VH-034.

[37] На фиг. 8 представлена таблица, в которой показано, что Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающее средство VH T29D или связывающее средство VH S55D, демонстрируют улучшенное размножение Т-клеток *in vivo*.

[38] На фиг. 9 представлена таблица, в которой показано, что Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающее средство для CD19 VH T29D или S55D, демонстрировали меньшее истощение Т-клеток по сравнению с исходным связывающим средством для CD19 VH-034.

[39] На фиг. 10 представлен график, на котором показано, что Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающее средство VH T29D или связывающее средство VH S55D, демонстрировали контроль опухоли.

[40] На фиг. 11 представлен график, на котором показаны несконденсированные индивидуальные данные мышинной модели, иллюстрирующие тот же результат, который показан на фиг. 10.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[41] При реализации на практике настоящего изобретения будут применяться, если не указано иное, обычные методики молекулярной биологии (в том числе рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Такие методики полностью объяснены в литературе, такой как "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", второе издание (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, а также периодически выходящие исправленные и дополненные издания); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001); Harlow, Lane and Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); и Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988).

[42] В случае, когда представлен диапазон значений, необходимо понимать, что каждое промежуточное значение до десятой доли единицы измерения нижнего предела, если контекст явно не указывает иное, между верхними и нижними пределами данного диапазона и любое другое указанное или промежуточное значение в данном указанном диапазоне охвачено в настоящем изобретении. Верхние и нижние пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также быть охвачены в настоящем изобретении, за исключением любого особым образом исключенного предела в указанном диапазоне. В случае, когда указанный диапазон включает один или оба из этих пределов, диапазоны, исключающие один или оба из этих включенных пределов, также включены в настоящее изобретение.

[43] Если не указано иное, остатки антител в данном документе пронумерованы в соответствии с системой нумерации согласно Kabat (например, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[44] В следующем описании представлены многочисленные конкретные детали для обеспечения более полного понимания настоящего изобретения. Однако специалисту в данной области техники будет очевидно, что настоящее изобретение может быть реализовано на практике без одной или нескольких из этих конкретных деталей. В других случаях хорошо известные характеристики и процедуры, хорошо известные специалистам в данной области техники, не были описаны в целях избежания затруднения понимания настоящего изобретения.

[45] Все литературные источники, цитируемые во всем настоящем раскрытии, в том числе патентные заявки и публикации, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

I. Определения

[46] Под "содержащим" подразумевается, что перечисленные элементы требуются в композиции/способе/наборе, но другие элементы могут быть включены для образования композиции/способа/набора и т. п. в пределах объема пункта формулы изобретения.

[47] Под "состоящим по сути из" подразумевается ограничение объема описанных композиции или способа конкретными материалами или стадиями, которые существенно не влияют на основную(основные) и новую(новые) характеристику(характеристик) заявленного изобретения.

[48] Под "состоящим из" подразумевается исключение из композиции, способа или набора любого элемента, стадии или ингредиента, не указанных в пункте формулы изобретения.

[49] Остатки антител в данном документе пронумерованы в соответствии с системой нумерации согласно Kabat и системой нумерации согласно EU. Система нумерации согласно Kabat обычно применяется при обозначении остатка в переменном домене (примерно остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "Система нумерации согласно EU" или "EU-индекс" обычно применяется при обозначении остатка в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, EU-индекс, описанный в Kabat *et al.*, см. выше). "EU-индекс согласно Kabat" относится к нумерации согласно EU остатков человеческого антитела IgG1. Если не указано иное, ссылки на номера остатков в переменном домене антител означают нумерацию остатков по системе нумерации согласно Kabat. Если в данном документе не указано иное, ссылки на номера остатков в константном домене антител означают нумерацию остатков по системе нумерации согласно EU.

[50] Антитела, также называемые иммуноглобулинами, обычно содержат по меньшей мере одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, где аминоконцевой домен тяжелой и легкой цепей является переменным по последовательности, поэтому его обычно называют доменом переменной области или переменным доменом тяжелой цепи (VH) или переменным доменом легкой цепи (VL). Два домена обычно связываются с образованием области специфического связывания, хотя, как будет обсуждаться в данном

документе, специфическое связывание также может быть получено с переменными последовательностями, представленными только тяжелыми цепями, и множество не встречающихся в природе конфигураций антител известны и применяются в данной области техники.

[51] "Функциональное" или "биологически активное" антитело или антигенсвязывающая молекула (в том числе антитела, содержащие только тяжелые цепи, и полиспецифические (например, биспецифические) трехцепочечные антителоподобные молекулы (ТСА, описанные в данном документе) могут характеризоваться одним или несколькими своими естественными видами активности в структурных, регуляторных, биохимических или биофизических явлениях. Например, функциональное антитело или другая связывающая молекула, например, ТСА, может характеризоваться способностью специфически связывать антиген, и связывание, в свою очередь, может приводить к индукции или изменению клеточного или молекулярного явления, такого как передача сигнала или ферментативная активность. Функциональное антитело или другая связывающая молекула, например, ТСА, может также блокировать активацию рецептора лигандом или действовать как агонист или антагонист. Способность антитела или другой связывающей молекулы, например, ТСА, характеризоваться одним или несколькими своими естественными видами активности зависит от нескольких факторов, в том числе правильной укладки и сборки полипептидных цепей.

[52] Термин "антитело" используется в данном документе в самом широком смысле и, в частности, охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, мономеры, димеры, полимеры, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), антитела, содержащие только тяжелые цепи, трехцепочечные антитела, ТСА, одноцепочечные Fv (scFv), наноантитела и т. п., а также предусматривает фрагменты антител, если они характеризуются требуемой биологической активностью (Miller et al (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). Антитела могут быть мышинными, человеческими, гуманизированными, химерными или полученными из других видов.

[53] Термин антитело может относиться к полноразмерной тяжелой цепи, полноразмерной легкой цепи, интактной молекуле иммуноглобулина или иммунологически активной части любого из таких полипептидов, т. е. полипептиду, который содержит антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывает антиген мишени, представляющей интерес, или его часть; такие мишени включают без ограничения раковую клетку или клетки, которые продуцируют аутоиммунные антитела, ассоциированные с аутоиммунным заболеванием. Иммуноглобулин, раскрытый в данном документе, может относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекулы иммуноглобулина, в том числе сконструированным подклассам с измененными Fc-частями, которые обеспечивают уменьшенную или усиленную активность эффекторных клеток. Легкие цепи рассматриваемых антител могут представлять собой легкие цепи каппа (V-каппа-цепи) или легкие цепи лямбда (V-лямбда-цепи). Иммуноглобулины могут

быть получены из любых видов. В одном аспекте иммуноглобулин преимущественно характеризуется человеческим происхождением.

[54] Термин "моноклональное антитело", применяемый в данном документе, относится к антителу, полученному из популяции по сути гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела характеризуются высокой специфичностью и направлены против единственного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от обычных (поликлональных) препаратов на основе антител, которые, как правило, включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против единственной детерминанты антигена. Моноклональные антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены посредством метода гибридом, впервые описанного Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495, и также могут быть получены, например, посредством способов получения рекомбинантного белка (см., например, патент США № 4816567).

[55] Термин "вариабельный", применяемый в связи с антителами, относится к тому факту, что определенные части вариабельных доменов антител значительно различаются по последовательности среди антител и используются для связывания и проявления специфичности каждого конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако вариабельность неравномерно распределена по вариабельным доменам антител. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых гипервариабельными областями, в вариабельных доменах как легкой цепи, так и тяжелой цепи. Более высококонсервативные части вариабельных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый из вариабельных доменов нативной тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR, главным образом принимающие конфигурацию β -листа, соединенные тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющие структуру β -листа и в некоторых случаях образующие ее часть. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости друг от друга посредством FR и вместе с гипервариабельными областями из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Константные домены не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но выполняют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

[56] Термин "гипервариабельная область", применяемый в данном документе, относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область обычно содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области" или "CDR" (например, остатки 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health,

Bethesda, MD. (1991)) и/или такие остатки из остатков 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) "гипервариабельной петли" в вариабельном домене тяжелой цепи; Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). В некоторых вариантах осуществления "CDR" означает определяющую комплементарность область антитела, как определено в Lefranc, MP et al., IMGT, the International ImMunoGeneTics database, *Nucleic Acids Res.*, 27:209-212 (1999). Остатки "каркасной области" или "FR" представляют собой остатки вариабельного домена, отличные от остатков гипервариабельной области/CDR, определенных в данном документе.

[57] Иллюстративные обозначения CDR показаны в данном документе; однако специалисту в данной области техники будет понятно, что обычно используется ряд определений CDR, в том числе определение согласно Kabat (см. "Zhao et al. A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions." *Mol Immunol.* 2010;47:694-700), которое основано на вариабельности последовательностей и является наиболее широко применяемым. Определение согласно Chothia основано на положении областей структурных петель (Chothia et al. "Conformations of immunoglobulin hypervariable regions." *Nature.* 1989; 342:877-883). Альтернативные определения CDR, представляющие интерес, включают без ограничения определения, раскрытые в Honegger, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool." *J Mol Biol.* 2001;309:657-670; Ofran et al. "Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B-cell epitopes." *J Immunol.* 2008;181:6230-6235; Almagro "Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires." *J Mol Recognit.* 2004;17:132-143; и Padlan et al. "Identification of specificity-determining residues in antibodies." *Faseb J.* 1995;9:133-139, каждый из которых конкретно включен в данный документ посредством ссылки.

[58] Термины "антитело, содержащее только тяжелые цепи" и "антитело на основе тяжелых цепей" применяются в данном документе взаимозаменяемо и относятся в самом широком смысле к антителам или к одной или нескольким частям антитела, например, одному или нескольким плечам антитела, отсутствию легкой цепи традиционного антитела. Термины конкретно включают без ограничения гомодимерные антитела, содержащие антигенсвязывающий домен VH и константные домены CH2 и CH3 в отсутствие домена CH1; функциональные (антигенсвязывающие) варианты таких антител, растворимые варианты VH, Ig-NAR, содержащие гомодимер одного вариабельного домена (V-NAR) и пяти C-подобных константных доменов (C-NAR), и их функциональные фрагменты, а также растворимые однодоменные антитела (sUniDabs™). В одном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена вариабельной области, состоящего из каркасной области 1, CDR1, каркасной области 2, CDR2, каркасной области 3, CDR3 и каркасной области 4. В другом варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из

антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и доменов СН2 и СН3. В другом варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и домена СН2. В дополнительном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и домена СН3. В данном документе также предусмотрены антитела, содержащие только тяжелые цепи, в которых домен СН2 и/или СН3 является усеченным. В дополнительном варианте осуществления тяжелая цепь состоит из антигенсвязывающего домена и по меньшей мере одного домена СН (СН1, СН2, СН3 или СН4), но не содержит шарнирную область. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, может находиться в форме димера, в котором две тяжелые цепи связаны дисульфидной связью или иным образом ковалентно или нековалентно присоединены друг к другу. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, может принадлежать к подклассу IgG, но в данном документе также предусмотрены антитела, принадлежащие к другим подклассам, таким как подклассы IgM, IgA, IgD и IgE. В конкретном варианте осуществления антитело на основе тяжелых цепей относится к подтипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, в частности к подтипу IgG1 или IgG4. В одном варианте осуществления антитело на основе тяжелых цепей относится к подтипу IgG4, где один или несколько доменов СН модифицированы с изменением эффекторной функции антитела. В одном варианте осуществления антитело на основе тяжелых цепей относится к подтипу IgG1 или IgG4, где один или несколько доменов СН модифицированы с изменением эффекторной функции антитела. В данном документе дополнительно описаны модификации доменов СН, которые обеспечивают изменение эффекторной функции. Неограничивающие примеры антител на основе тяжелых цепей описаны, например, в WO 2018/039180, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[59] В некоторых вариантах осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, по данному документу применяют в качестве связывающего (нацеливающего) домена химерного антигенного рецептора (CAR). Определение конкретно включает человеческие антитела, содержащие только тяжелые цепи, продуцируемые крысами, трансгенными по иммуноглобулину человека (UniRatTM), называемые UniAbsTM. Варибельные области (VH) UniAbsTM называются UniDabsTM и представляют собой универсальные строительные блоки, которые можно связать с Fc-областями или сывороточным альбумином для разработки новых терапевтических средств с полиспецифичностью, повышенной эффективностью и продленным периодом полувыведения. Поскольку в гомодимерных UniAbsTM отсутствует легкая цепь и, следовательно, домен VL, антиген распознается одним-единственным доменом, т. е. варибельным доменом тяжелой цепи антитела на основе тяжелых цепей (VH или VHN).

[60] "Интактная цепь антитела", применяемая в данном документе, представляет собой цепь, содержащую полноразмерную варибельную область и полноразмерную константную область (Fc). Интактное "традиционное" антитело содержит интактную

легкую цепь и интактную тяжелую цепь, а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи: CH1, шарнир, CH2 и CH3 для секретируемого IgG. Другие изотипы, такие как IgM или IgA, могут содержать другие домены CH. Константные домены могут представлять собой константные домены нативной последовательности (например, константные домены человеческой нативной последовательности) или варианты их аминокислотной последовательности. Интактное антитело может характеризоваться одной или несколькими "эффекторными функциями", которые относятся к тем видам биологической активности, которые приписываются константной Fc-области (Fc-области с нативной последовательностью или Fc-области варианта аминокислотной последовательности) антитела. Примеры эффекторных функций антител включают связывание C1q; комплементзависимую цитотоксичность; связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз и снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности. Варианты константной области предусматривают те, которые обеспечивают изменение эффекторного профиля, связывания с Fc-рецепторами и т. п.

[61] В зависимости от аминокислотной последовательности Fc (константного домена) их тяжелых цепей антитела и различные антигенсвязывающие белки могут быть представлены в виде разных классов. Существует пять основных классов Fc-областей тяжелой цепи: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на "подклассы" (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные Fc-домены, которые соответствуют разным классам антител, могут обозначаться как α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации разных классов иммуноглобулинов являются хорошо известными. Формы Ig предусматривают шарнирные модификации или бесшарнирные формы (Roux et al. (1998) *J. Immunol.* 161:4083-4090; Lund et al (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:7246-7256; US 2005/0048572; US 2004/0229310). Легкие цепи антител любых видов позвоночных могут быть отнесены к одному из двух типов, называемых κ (каппа) и λ (лямбда), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Антитела в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения могут содержать последовательности легкой каппа-цепи или последовательности легкой лямбда-цепи.

[62] "Функциональная Fc-область" обладает "эффекторной функцией" Fc-области с нативной последовательностью. Неограничивающие примеры эффекторных функций включают связывание C1q; CDC; связывание Fc-рецептора; ADCC; ADCP; снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора) и т. п. Такие эффекторные функции обычно требуют, чтобы Fc-область взаимодействовала с рецептором, например, рецепторами Fc γ RI; Fc γ RIIA; Fc γ RIIB1; Fc γ RIIB2; Fc γ RIIA; Fc γ RIIB и низкоаффинным рецептором FcRn; и могут быть оценены с применением различных анализов, известных из уровня техники. "Мертвая" или "подвергнутая сайленсингу" Fc-область представляет собой такую область, которая была мутирована с сохранением активности в отношении, например, продления периода полувыведения из

сыворотки крови, но которая не активирует высокоаффинный Fc-рецептор или которая характеризуется уменьшенной аффинностью к Fc-рецептору.

[63] "Fc-область с нативной последовательностью" содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, обнаруженной в природе. Человеческие Fc-области с нативной последовательностью предусматривают, например, Fc-область человеческого IgG1 с нативной последовательностью (аллотипы, отличные от A, и аллотипы A); Fc-область человеческого IgG2 с нативной последовательностью; Fc-область человеческого IgG3 с нативной последовательностью и Fc-область человеческого IgG4 с нативной последовательностью, а также их встречающиеся в природе варианты.

[64] "Вариант Fc-области" содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от такой последовательности в Fc-области с нативной последовательностью на по меньшей мере одну аминокислотную модификацию, предпочтительно одну или несколько аминокислотных замен. Предпочтительно вариант Fc-области характеризуется по меньшей мере одной аминокислотной заменой по сравнению с Fc-областью с нативной последовательностью или Fc-областью исходного полипептида, например, имеет от приблизительно одной до приблизительно десяти аминокислотных замен и предпочтительно от приблизительно одной до приблизительно пяти аминокислотных замен в Fc-области с нативной последовательностью или в Fc-области исходного полипептида. Вариант Fc-области по данному документу будет предпочтительно обладать по меньшей мере приблизительно 80% гомологией с Fc-областью с нативной последовательностью и/или с Fc-областью исходного полипептида и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% гомологией с ними, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% гомологией с ними.

[65] Варианты последовательностей Fc могут предусматривать три аминокислотные замены в области CH2 для уменьшения связывания FcγRI в положениях 234, 235 и 237 согласно EU-индексу (см. Duncan et al., (1988) *Nature* 332:563). Две аминокислотные замены в сайте связывания комплемента C1q в положениях 330 и 331 согласно EU-индексу обеспечивают уменьшение фиксации комплемента (см. Tao et al., *J. Exp. Med.* 178:661 (1993) и Canfield and Morrison, *J. Exp. Med.* 173:1483 (1991)). Замена остатками человеческого IgG1 или IgG2 в положениях 233-236 и остатками IgG4 в положениях 327, 330 и 331 обеспечивает значительное уменьшение ADCC и CDC (см., например, Armour KL. *et al.*, 1999 *Eur J Immunol.* 29(8):2613-24; и Shields RL. *et al.*, 2001. *J Biol Chem.* 276(9):6591-604). Аминокислотная последовательность Fc человеческого IgG4 (UniProtKB № P01861) представлена в данном документе под SEQ ID NO: 76. Подвергнутый сайленсингу IgG1 описан, например, в Boesch, A.W., et al., "Highly parallel characterization of IgG Fc binding interactions." *MAbs*, 2014. 6(4): p. 915-27, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[66] Возможны и другие варианты Fc, в том числе без ограничения вариант, в котором подвергнута делеции область, способная образовывать дисульфидную связь, или

в котором удалены определенные аминокислотные остатки на N-конце нативного Fc, или к которому добавлен остаток метионина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления одна или несколько Fc-частей антитела могут характеризоваться одной или несколькими мутациями в шарнирной области с устранением дисульфидной связи. В еще одном варианте осуществления шарнирная область Fc может быть полностью удалена. В еще одном варианте осуществления антитело может содержать вариант Fc.

[67] Кроме того, можно сконструировать вариант Fc для удаления или значительного снижения эффекторных функций посредством замены (мутирования), делеции или добавления аминокислотных остатков для воздействия на связывание комплемента или связывание Fc-рецептора. Например, и без ограничения, делеция может происходить в сайте связывания комплемента, таком как сайт связывания C1q. Методики получения таких производных последовательностей Fc-фрагмента иммуноглобулина раскрыты в международных публикациях заявок на патент №№ WO 97/34631 и WO 96/32478. Кроме того, Fc-домен может быть модифицирован посредством фосфорилирования, сульфатирования, ацилирования, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования, ацетилирования, амидирования и т. п.

[68] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариант человеческой последовательности домена CH3 IgG4, характеризующийся мутацией T366W, который необязательно может называться в данном документе последовательностью с выступом CH3 IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариант человеческой последовательности домена CH3 IgG4, характеризующийся мутацией T366S, мутацией L368A и мутацией Y407V, который необязательно может называться в данном документе последовательностью со впадиной CH3 IgG4. Мутации CH3 IgG4, описанные в данном документе, можно использовать любым подходящим способом, чтобы поместить "выступ" на первой константной области тяжелой цепи первого мономера в димере антитела и "впадину" на второй константной области тяжелой цепи второго мономера в димере антитела, за счет чего облегчается правильное спаривание (гетеродимеризация) требуемой пары полипептидных субъединиц тяжелой цепи в антителе.

[69] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит полипептидную субъединицу тяжелой цепи, содержащую вариант Fc-области человеческого IgG4, содержащий мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A и мутацию T366W (выступ). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит полипептидную субъединицу тяжелой цепи, содержащую вариант Fc-области человеческого IgG4, содержащий мутацию S228P, мутацию F234A, мутацию L235A, мутацию T366S, мутацию L368A и мутацию Y407V (впадина).

[70] Термин "антитело, содержащее Fc-область" относится к антителу, которое содержит Fc-область. С-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с системой нумерации согласно EU) Fc-области может быть удален, например, во время очистки антитела или посредством рекомбинантной инженерии нуклеиновой кислоты,

кодирующей антитело. Соответственно, антитело, содержащее Fc-область в соответствии с настоящим изобретением, может содержать антитело с или без K447.

[71] Аспекты настоящего изобретения включают антитела, содержащие переменную область, представленную только тяжелыми цепями, в моновалентной или бивалентной конфигурации. Применяемый в данном документе термин "моновалентная конфигурация", используемый в отношении домена переменной области, представленной только тяжелыми цепями, означает, что присутствует только один домен переменной области, представленной только тяжелыми цепями, характеризующийся единственным сайтом связывания. В отличие от этого, термин "бивалентная конфигурация", применяемый в отношении домена переменной области, представленной только тяжелыми цепями, означает, что присутствуют два домена переменной области, представленной только тяжелыми цепями (каждый из которых характеризуется единственным сайтом связывания), и они соединены линкерной последовательностью. Неограничивающие примеры линкерных последовательностей обсуждаются далее в данном документе и включают без ограничения линкерные последовательности GS различной длины. Когда переменная область, представленная только тяжелыми цепями, находится в бивалентной конфигурации, каждый из двух доменов переменной области, представленной только тяжелыми цепями, может связываться с одним и тем же антигеном или с разными антигенами (например, с разными эпитопами на одном и том же белке; с двумя разными белками и т. д.). Однако, если конкретно не указано иное, переменная область, представленная только тяжелыми цепями, обозначенная как находящаяся в "бивалентной конфигурации", подразумевается как содержащая два идентичных домена переменной области, представленной только тяжелыми цепями, соединенных линкерной последовательностью, где каждый из двух идентичных доменов переменной области, представленной только тяжелыми цепями, связывается с одним и тем же антигеном-мишенью.

[72] Аспекты настоящего изобретения включают антитела, характеризующиеся полиспецифическими конфигурациями, которые включают без ограничения биспецифические, триспецифические и т. д. Известно большое разнообразие способов и конфигураций белков, которые применяются в биспецифических моноклональных антителах (BsMAb), триспецифических антителах и т. д.

[73] Были разработаны различные способы получения поливалентных искусственных антител посредством рекомбинантного слияния переменных доменов двух или более антител. В некоторых вариантах осуществления первый и второй антигенсвязывающие домены в полипептиде соединены полипептидным линкером. Один неограничивающий пример такого полипептидного линкера представляет собой линкер GS, содержащий аминокислотную последовательность из четырех остатков глицина, за которыми следует один остаток серина, и где последовательность повторяется n раз, где n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до приблизительно 10, такое как 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9. Неограничивающие примеры таких линкеров включают GGGGS (SEQ ID

NO: 38) (n=1) и GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 39) (n=2). Также могут быть применены другие подходящие линкеры, которые описаны, например, в Chen et al., *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 October 15; 65(10): 1357-69, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[74] Термин "трехцепочечная антителоподобная молекула" или "ТСА" применяется в данном документе для обозначения антителоподобных молекул, содержащих три полипептидные субъединицы, состоящих по сути из них или состоящих из них, две из которых содержат одну тяжелую и одну легкую цепь моноклонального антитела или функциональные антигенсвязывающие фрагменты таких цепей антител, содержащие антигенсвязывающую область и по меньшей мере один домен СН, состоят по сути из них или состоят из них. Эта пара тяжелая цепь/легкая цепь характеризуется специфичностью связывания с первым антигеном. Третья полипептидная субъединица содержит антитело, содержащее только тяжелые цепи, содержащее Fc-часть, содержащую домены СН2, и/или СН3, и/или СН4 в отсутствие домена СН1, и один или несколько антигенсвязывающих доменов (например, два антигенсвязывающих домена), которые связывают эпитоп второго антигена или другой эпитоп первого антигена, состоит по сути из них или состоит из них, где такой связывающий домен получен из вариабельной области тяжелой или легкой цепи антитела или характеризуется идентичностью последовательности с ней. Части такой вариабельной области могут кодироваться генными сегментами V_H и/или V_L , генными сегментами D и J_H или генными сегментами J_L . Вариабельная область может кодироваться реаранжированными генными сегментами V_HDJ_H , V_LDJ_H , V_HJ_L или V_LJ_L .

[75] В качестве соединения, связывающего ТСА, используется "антитело, содержащее только тяжелые цепи", или "антитело на основе тяжелых цепей", или "полипептид на основе тяжелых цепей", которые, как применяется в данном документе, означают одноцепочечное антитело, содержащее константные области тяжелой цепи СН2, и/или СН3, и/или СН4, но не домен СН1. В одном варианте осуществления антитело на основе тяжелых цепей состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и доменов СН2 и СН3. В другом варианте осуществления антитело на основе тяжелых цепей состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и домена СН2. В дополнительном варианте осуществления антитело на основе тяжелых цепей состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и домена СН3. В данном документе также предусмотрены антитела на основе тяжелых цепей, в которых домен СН2 и/или СН3 является усеченным. В дополнительном варианте осуществления тяжелая цепь состоит из антигенсвязывающего домена и по меньшей мере одного домена СН (СН1, СН2, СН3 или СН4), но не содержит шарнирной области. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, может быть в форме димера, в котором две тяжелые цепи связаны дисульфидной связью или иным образом ковалентно или нековалентно присоединены друг к другу, и может необязательно характеризоваться асимметричной поверхностью границы взаимодействия (например, поверхностью границы взаимодействия "выступы-во-впадины" (K_iH)) между

одним или несколькими доменами СН для облегчения правильного спаривания между полипептидными цепями. Антитело на основе тяжелых цепей может принадлежать к подклассу IgG, но в данном документе также предусмотрены антитела, принадлежащие к другим подклассам, таким как подклассы IgM, IgA, IgD и IgE. В конкретном варианте осуществления антитело на основе тяжелых цепей относится к подтипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, в частности к подтипу IgG1 или подтипу IgG4. Неограничивающие примеры соединения, связывающего ТСА, описаны, например, в WO 2017/223111 и WO 2018/052503, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[76] Антитела на основе тяжелых цепей составляют приблизительно четверть антител IgG, продуцируемых верблюдовыми, например, верблюдами и ламами (Hamers-Casterman C., et al. *Nature*. 363, 446-448 (1993)). Данные антитела образованы двумя тяжелыми цепями, но не содержат легкие цепи. Как следствие, вариабельная антигенсвязывающая часть обозначается как домен VHH, и она представляет собой наименьший встречающийся в природе интактный антигенсвязывающий сайт длиной всего около 120 аминокислот (Desmyter, A., et al. *J. Biol. Chem.* 276, 26285-26290 (2001)). Антитела на основе тяжелых цепей с высокой специфичностью и аффинностью могут быть получены к различным антигенам посредством иммунизации (van der Linden, R.H., et al. *Biochim. Biophys. Acta.* 1431, 37-46 (1999)), и часть VHH можно легко клонировать и экспрессировать в дрожжах (Frenken, L. G. J., et al. *J. Biotechnol.* 78, 11-21 (2000)). Их уровни экспрессии, растворимости и стабильности значительно выше, чем у классических фрагментов F(ab) или Fv (Ghahroudi, M.A. et al. *FEBS Lett.* 414, 521-526 (1997)). Также было показано, что у акул имеется единственный VH-подобный домен в их антителах, называемый VNAR. (Nuttall et al. *Eur. J. Biochem.* 270, 3543-3554 (2003); Nuttall et al. *Function and Bioinformatics* 55, 187-197 (2004); Dooley et al., *Molecular Immunology* 40, 25-33 (2003)).

[77] Термин "CD19", применяемый в данном документе, относится к трансмембранному гликопротеину размером 95 кДа, который принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов и функционирует в качестве корецептора комплекса В-клеточного антигенного рецептора (BCR) на В-лимфоцитах. Термин "CD19" включает любой белок CD19 человека и отличных от человека видов животных и, в частности, включает человеческий CD19, а также CD19 отличных от человека млекопитающих.

[78] Применяемый в данном документе термин "человеческий CD19" предусматривает любые варианты, изоформы и видовые гомологи человеческого CD19 (UniProt P15391), независимо от его источника или способа получения. Таким образом, "человеческий CD19" включает человеческий CD19, естественно экспрессируемый клетками, и CD19, экспрессируемый на клетках, трансфицированных с помощью человеческого гена CD19.

[79] Термины "антитело к CD19, содержащее только тяжелые цепи", "антитело к CD19 только с тяжелыми цепями", "антитело к CD19, состоящее из тяжелых цепей" и

"антитело к CD19 на основе тяжелых цепей" применяются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения антитела, содержащего только тяжелые цепи, как определено выше, иммуноспецифически связывающегося с CD19, в том числе человеческим CD19, как определено выше. Определение включает без ограничения человеческие антитела на основе тяжелых цепей, продуцируемые трансгенными животными, такими как трансгенные крысы или трансгенные мыши, экспрессирующие иммуноглобулин человека, в том числе UniRatsTM, продуцирующие человеческие антитела к CD19 UniAbTM, как определено выше в данном документе.

[80] "Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" в отношении последовательности референтного полипептида определяется в виде процентной доли аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в последовательности референтного полипептида, после выравнивания последовательностей и введения гэпов при необходимости для достижения максимального процента идентичности последовательности и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание для целей определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые находятся в пределах компетенции специалиста в данной области техники, например, с применением общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, в том числе любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине последовательностей, подлежащих сравнению. Однако для целей настоящего изобретения значения % идентичности аминокислотной последовательности генерируют с применением компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2.

[81] "Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено из компонента своего естественного окружения. Загрязняющими компонентами его естественного окружения являются материалы, которые будут мешать диагностическим или терапевтическим вариантам применения антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления антитело будет очищено (1) до более чем 95% по весу антитела согласно определению по методу Лоури и наиболее предпочтительно до более чем 99% по весу, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с помощью секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности согласно SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с применением кумасси синего или предпочтительно красителя на основе серебра. Выделенное антитело предусматривает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент естественного окружения антитела не будет присутствовать. Однако, обычно выделенное антитело будет

получено посредством по меньшей мере одной стадии очистки.

[82] Антитела по настоящему изобретению предусматривают полиспецифические антитела. Полиспецифические антитела характеризуются более чем одной специфичностью связывания. Термин "полиспецифический" конкретно включает "биспецифический" и "триспецифический", а также аффинности независимого специфического связывания более высокого порядка, такие как полиэпитопная специфичность более высокого порядка, а также тетравалентные антитела и фрагменты антител. Термины "полиспецифическое антитело", "полиспецифическое антитело, содержащее только тяжелые цепи", "полиспецифическое антитело на основе тяжелых цепей" и "полиспецифическое UniAbTM" применяются в данном документе в наиболее широком смысле, и они охватывают все антитела с более чем одной специфичностью связывания. Полиспецифические антитела к CD19 на основе тяжелых цепей по настоящему изобретению конкретно включают антитела, иммуноспецифически связывающиеся с двумя или более неперекрывающимися эпитопами на белке CD19, таком как человеческий CD19 (т. е. бивалентные и бипаратопные). Полиспецифические антитела к CD19 на основе тяжелых цепей по настоящему изобретению также конкретно включают антитела, иммуноспецифически связывающиеся с эпитопом на белке CD19, таком как человеческий CD19, и с эпитопом на другом белке, таком как, например, белок CD3, такой как человеческий CD3 (т. е. бивалентные и бипаратопные). Полиспецифические антитела к CD19 на основе тяжелых цепей по настоящему изобретению также конкретно включают антитела, иммуноспецифически связывающиеся с двумя или более неперекрывающимися или частично перекрывающимися эпитопами на белке CD19, таком как человеческий белок CD19, и с эпитопом на другом белке, таком как, например, белок CD3, такой как человеческий белок CD3 (т. е. тривалентные и бипаратопные).

[83] Антитела по настоящему изобретению предусматривают моноспецифические антитела, характеризующиеся одной специфичностью связывания. Моноспецифические антитела конкретно предусматривают антитела, предусматривающие единственную специфичность связывания, а также антитела, содержащие более одной связывающей единицы, характеризующейся одинаковой специфичностью связывания. Термины "моноспецифическое антитело", "моноспецифическое антитело, содержащее только тяжелые цепи", "моноспецифическое антитело на основе тяжелых цепей" и "моноспецифическое UniAbTM" применяются в данном документе в наиболее широком смысле и охватывают все антитела с одной специфичностью связывания. Моноспецифические антитела к CD19 на основе тяжелых цепей по настоящему изобретению конкретно включают антитела, иммуноспецифически связывающиеся с одним эпитопом на белке CD19, таком как человеческий белок CD19 (моновалентные и моноспецифические). Моноспецифические антитела к CD19 на основе тяжелых цепей по настоящему изобретению также конкретно включают антитела, имеющие более одной связывающей единицы (например, поливалентные антитела), иммуноспецифически связывающиеся с эпитопом на белке CD19, таком как человеческий CD19. Например,

моноспецифическое антитело в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения может включать переменную область тяжелой цепи, содержащую два антигенсвязывающих домена, где каждый антигенсвязывающий домен связывается с одним и тем же эпитопом на белке CD19 (т. е. бивалентное и моноспецифическое).

[84] "Эпитоп" представляет собой сайт на поверхности молекулы антигена, с которым связывается единственная молекула антитела. Обычно антиген имеет несколько или множество разных эпитопов и реагирует со многими различными антителами. Термин конкретно предусматривает линейные эпитопы и конформационные эпитопы.

[85] "Картирование эпитопов" представляет собой процесс идентификации сайтов связывания или эпитопов антител на их антигенах-мишенях. Эпитопы антител могут представлять собой линейные эпитопы или конформационные эпитопы. Линейные эпитопы образованы непрерывной последовательностью аминокислот в белке. Конформационные эпитопы образованы аминокислотами, которые являются прерывистыми в белковой последовательности, но которые объединяются при сворачивании белка в его трехмерную структуру.

[86] "Полиэпитопная специфичность" обозначает способность специфически связываться с двумя или более разными эпитопами на одной или разных мишенях. Как отмечалось выше, настоящее изобретение конкретно включает антитела к CD19 на основе тяжелых цепей с видами полиэпитопной специфичности, т. е. антитела к CD19 на основе тяжелых цепей, связывающиеся с одним или несколькими неперекрывающимися эпитопами на белке CD19, таком как человеческий CD19; и антитела к CD19 на основе тяжелых цепей, связывающиеся с одним или несколькими эпитопами на белке CD19 и с эпитопом на другом белке, таком как, например, белок CD3. Термин "неперекрывающийся(неперекрывающиеся) эпитоп(эпитопы)" или "неконкурентный(неконкурентные) эпитоп(эпитопы)" антигена определяется в данном документе как означающий эпитоп(эпитопы), которые распознаются одним представителем пары антигенспецифических антител, но не другим представителем. Пары антител или антигенсвязывающие области, нацеливающиеся на один и тот же антиген, в полиспецифическом антителе, распознающие неперекрывающиеся эпитопы, не конкурируют за связывание с этим антигеном и способны связывать этот антиген одновременно.

[87] Антитело связывается "по сути с тем же эпитопом", что и референтное антитело, если два антитела распознают идентичные или стерически перекрывающиеся эпитопы. Наиболее широко применяемыми и быстрыми способами определения того, связываются ли два эпитопа с идентичными или стерически перекрывающимися эпитопами, являются конкурентные анализы, которые могут быть сконфигурированы во множестве разных форматов с применением либо меченого антигена, либо меченого антитела. Обычно антиген иммобилизуют на 96-луночном планшете, и способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител измеряют с применением радиоактивных или ферментных меток.

[88] Применяемый в данном документе термин "валентный" относится к конкретному количеству сайтов связывания в молекуле антитела.

[89] "Моновалентное" антитело имеет один сайт связывания. Таким образом, моновалентное антитело также является моноспецифическим.

[90] "Поливалентное" антитело имеет два или более сайта связывания. Таким образом, термины "бивалентный", "тривалентный" и "тетравалентный" относятся к наличию двух сайтов связывания, трех сайтов связывания и четырех сайтов связывания соответственно. Таким образом, биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением является по меньшей мере бивалентным и может быть тривалентным, тетравалентным или иным образом поливалентным. Бивалентное антитело в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения может иметь два сайта связывания с одним и тем же эпитопом (т. е. бивалентное, монопаратопное) или с двумя разными эпитопами (т. е. бивалентное, бипаратопное).

[91] Известно большое разнообразие способов и конфигураций белков, которые применяются для получения биспецифических моноклональных антител (BsMAB), триспецифических антител и т. п.

[92] Термин "трехцепочечная антителоподобная молекула" или "ТСА" применяется в данном документе для обозначения антителоподобных молекул, содержащих три полипептидные субъединицы, состоящих по сути из них или состоящих из них, две из которых содержат одну тяжелую цепь и одну легкую цепь моноклонального антитела или функциональные антигенсвязывающие фрагменты таких цепей антител, содержащие антигенсвязывающую область и по меньшей мере один домен СН, состоят по сути из них или состоят из них. Эта пара тяжелая цепь/легкая цепь характеризуется специфичностью связывания с первым антигеном. Третья полипептидная субъединица содержит антитело, содержащее только тяжелые цепи, содержащее Fc-часть, содержащую домены СН2, и/или СН3, и/или СН4 в отсутствие домена СН1, и антигенсвязывающий домен, который связывает эпитоп второго антигена или другой эпитоп первого антигена, состоит по сути из них или состоит из них, где такой связывающий домен получен из вариабельной области тяжелой или легкой цепи антитела или характеризуется идентичностью последовательности с ней. Части такой вариабельной области могут кодироваться генными сегментами V_H и/или V_L , генными сегментами D и J_H или генными сегментами J_L . Вариабельная область может кодироваться реаранжированными генными сегментами V_HDJ_H , V_LDJ_H , V_HJ_L или V_LJ_L . В белке ТСА используется антитело, содержащее только тяжелые цепи, как определено выше.

[93] Термин "химерный антигенный рецептор" или "CAR" применяется в данном документе в наиболее широком смысле для обозначения сконструированного рецептора, который привносит требуемую специфичность связывания (например, антигенсвязывающую область моноклонального антитела или другого лиганда) к трансмембранным и внутриклеточным сигнальным доменам. Как правило, рецептор применяется для привнесения специфичности моноклонального антитела в Т-клетку с

целью создания химерных антигенных рецепторов (CAR). (*J Natl Cancer Inst*, 2015; 108(7):dvj439; и Jackson et al., *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2016; 13:370-383). CAR-T-клетки представляют собой Т-клетки, которые были генетически сконструированы для продуцирования искусственного Т-клеточного рецептора для применения в иммунотерапии. В одном варианте осуществления "CAR-T-клетка" означает Т-клетку для терапевтического применения, экспрессирующую трансген, кодирующий один или несколько химерных антигенных рецепторов, состоящих как минимум из внеклеточного домена, трансмембранного домена и по меньшей мере одного цитозольного домена.

[94] Термин "человеческое антитело" применяется в данном документе для обозначения антител, содержащих переменные и константные области, полученные из человеческих последовательностей иммуноглобулина зародышевого типа. Человеческие антитела по данному документу могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими последовательностями иммуноглобулина зародышевого типа, например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*. Термин "человеческое антитело" конкретно включает антитела, содержащие только тяжелые цепи, содержащие последовательности переменных областей тяжелых цепей человека, продуцируемые трансгенными животными, такими как трансгенные крысы или мыши, в частности, UniAbsTM, продуцируемые у UniRatTM, как определено в данном документе выше.

[95] Под "химерным антителом" или "химерным иммуноглобулином" подразумевают молекулу иммуноглобулина, содержащую аминокислотные последовательности из по меньшей мере двух разных локусов Ig, например, трансгенное антитело, содержащее часть, кодируемую локусом человеческого Ig, и часть, кодируемую локусом крысиного Ig. Химерные антитела предусматривают трансгенные антитела с отличными от человеческих Fc-областями или искусственными Fc-областями и человеческие идиотипы. Такие иммуноглобулины могут быть выделены из животных по настоящему изобретению, которые были сконструированы таким образом, чтобы продуцировать такие химерные антитела.

[96] Применяемый в данном документе термин "эффекторная клетка" относится к иммунной клетке, которая участвует в эффекторной фазе иммунного ответа, в отличие от фазы распознавания и фазы активации иммунного ответа. Некоторые эффекторные клетки экспрессируют специфические Fc-рецепторы и выполняют специфические иммунные функции. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка, такая как естественная клетка-киллер, способна индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Например, моноциты и макрофаги, которые экспрессируют FcR, участвуют в специфическом цитолизе клеток-мишеней и презентировании антигенов другим компонентам иммунной системы или связывании с клетками, которые презентруют антигены. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка может фагоцитировать антиген-мишень или клетку-мишень.

[97] "Человеческие эффекторные клетки" представляют собой лейкоциты, которые

экспрессируют рецепторы, такие как Т-клеточные рецепторы или FcR, и выполняют эффекторные функции. Предпочтительно клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и выполняют эффекторную функцию ADCC. Примеры человеческих лейкоцитов, которые опосредуют ADCC, включают естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы, при этом NK-клетки являются предпочтительными. Эффекторные клетки могут быть выделены из их естественного источника, например, из крови или PBMC, как описано в данном документе.

[98] Термин "иммунная клетка" используется в данном документе в наиболее широком смысле, включая без ограничения клетки миелоидного или лимфоидного происхождения, например, лимфоциты (такие как В-клетки и Т-клетки, в том числе цитолитические Т-клетки (CTL)), клетки-киллеры, естественные клетки-киллеры (NK), макрофаги, моноциты, эозинофилы, полиморфноядерные клетки, такие как нейтрофилы, гранулоциты, тучные клетки и базофилы.

[99] "Эффекторные функции" антитела относятся к тем видам биологической активности, которые приписываются Fc-области (Fc-области с нативной последовательностью или Fc-области с вариантом аминокислотной последовательности) антитела. Примеры эффекторных функций антител включают связывание C1q; комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора; BCR) и т. п.

[100] "Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность" и "ADCC" относятся к клеточноопосредованной реакции, при которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcR) (например, естественные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени. Основные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках обобщена в таблице 3 на странице 464 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Для оценки активности ADCC молекулы, представляющей интерес, может быть выполнен *in vitro* анализ ADCC, такой как описанный в патентах США №№ 5500362 или 5821337. Применимые эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные клетки-киллеры (NK). В качестве альтернативы или в качестве дополнения, активность ADCC молекулы, представляющей интерес, может быть оценена *in vivo*, например, в животной модели, такой как раскрытая в Clynes *et al. PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

[101] "Комплементзависимая цитотоксичность" или "CDC" относится к способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом), образующей комплекс с когнатным антигеном. Для

оценки активации комплемента может быть выполнен анализ CDC, например, как описано в Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

[102] "Аффинность связывания" относится к силе итоговой суммы нековалентных взаимодействий между единственным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, применяемый в данном документе термин "аффинность связывания" относится к истинной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между представителями пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно может быть представлена константой диссоциации (K_d). Аффинность можно измерить обычными способами, известными из уровня техники. Низкоаффинные антитела обычно медленно связывают антиген и характеризуются тенденцией к легкой диссоциации, тогда как высокоаффинные антитела обычно быстрее связывают антиген и характеризуются тенденцией к поддержанию связанного состояния.

[103] Применяемое в данном документе " K_d " или "значение K_d " относится к константе диссоциации, определенной посредством биослойной интерферометрии с применением прибора Octet QK384 (Fortebio Inc., Менло-Парк, Калифорния) в кинетическом режиме. Например, сенсоры на основе антитела к мышинной Fc нагружают слитым антигеном на основе мышинной Fc и затем погружают в лунки, содержащие антитела, для измерения скоростей ассоциации (k_{on}), зависящих от концентрации. Скорости диссоциации антител (k_{off}) измеряют на последней стадии, когда сенсоры погружают в лунки, содержащие только буфер. K_d представляет собой отношение k_{off}/k_{on} (для получения дополнительной подробной информации см. Consercion, J, et al., *Comb Chem High Throughput Screen*, 12(8), 791-800, 2009).

[104] Термины "лечение", "осуществление лечения" и т. п. применяются в данном документе в целом для обозначения достижения требуемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предупреждения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного эффекта, связанного с заболеванием. "Лечение", применяемое в данном документе, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего и включает: (a) предупреждение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого оно еще не диагностировано; (b) подавление заболевания, т. е. остановку его развития; или (c) облегчение заболевания, т. е. обеспечение регрессии заболевания. Терапевтическое средство можно вводить до, во время или после начала заболевания или повреждения. Особый интерес представляет лечение продолжающегося заболевания, когда лечение приводит к стабилизации или уменьшению нежелательных клинических симптомов у пациента. Такое лечение желательно проводить до полной потери функции у пораженных тканей. Рассматриваемое средство терапии можно вводить во время симптоматической стадии заболевания и в некоторых случаях после симптоматической стадии заболевания.

[105] "Терапевтически эффективное количество" означает количество активного средства, которое необходимо для обеспечения терапевтического эффекта у субъекта. Например, "терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, которое приводит к индуцированию, облегчению или иному обеспечению улучшения патологических симптомов, прогрессирования заболевания или физиологических состояний, ассоциированных с заболеванием, или которое улучшает устойчивость к нарушению.

[106] Термины "новообразования из В-клеток" или "новообразования из зрелых В-клеток" в контексте настоящего изобретения включают без ограничения все формы лимфоидного лейкоза и лимфомы, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, пролимфоцитарный лейкоз, лимфобластный лейкоз из предшественников В-клеток, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, В-клеточную пролимфоцитарную лимфому, В-клеточный хронический лимфолейкоз, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), множественную миелому, лимфоплазмоцитарную лимфому, лимфому из клеток маргинальной зоны селезенки, новообразования из плазматических клеток, такие как миелома из плазматических клеток, плазмоцитомы, болезнь отложения моноклональных иммуноглобулинов, болезнь тяжелых цепей, MALT-лимфому, узловую В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны, внутрисосудистую крупноклеточную В-клеточную лимфому, первичную выпотную лимфому, лимфоматоидный гранулематоз, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, волосатоклеточный лейкоз, первичную выпотную лимфому и неходжкинскую лимфому, связанную со СПИДом.

[107] Термин "характеризующийся экспрессией CD19" в широком смысле относится к любому заболеванию или нарушению, при котором экспрессия CD19 ассоциирована с одним или несколькими патологическими процессами, которые являются характерными для заболевания или нарушения, или вовлечена в них. Такие нарушения включают без ограничения новообразования из В-клеток.

[108] Термины "субъект", "индивидуум" и "пациент" применяются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения млекопитающего, подлежащего оценке в отношении лечения и/или подлежащего лечению. В одном варианте осуществления млекопитающее представляет собой человека. Термины "субъект", "индивидуум" и "пациент" охватывают без ограничения индивидуумов, у которых имеется рак, индивидуумов с аутоиммунными заболеваниями, с патогенными инфекциями и т. п. Субъекты могут представлять собой людей, но также могут предусматривать других млекопитающих, в частности, тех млекопитающих, которые применимы в качестве лабораторных моделей заболеваний человека, например, мышей, крыс и т. п.

[109] Термин "фармацевтический состав" относится к препарату, который представлен в такой форме, которая обеспечивает эффективную биологическую активность активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов,

неприемлемо токсичных для субъекта, которому будут вводить состав. Такие составы являются стерильными. "Фармацевтически приемлемые" вспомогательные вещества (среды-носители, добавки) представляют собой вспомогательные вещества, которые можно целесообразно вводить субъекту-млекопитающему для обеспечения эффективной дозы используемого активного ингредиента.

[110] "Стерильный" состав является асептическим или не содержит или по сути не содержит каких-либо живых микроорганизмов и их спор. "Замороженный" состав представляет собой состав, находящийся при температуре ниже 0°C.

[111] "Стабильный" состав представляет собой состав, в котором содержащийся белок по сути сохраняет свою физическую стабильность, и/или химическую стабильность, и/или биологическую активность при хранении. Предпочтительно состав по сути сохраняет свою физическую и химическую стабильность, а также свою биологическую активность при хранении. Срок хранения обычно выбирают, исходя из предполагаемого срока годности состава. В данной области техники доступны различные аналитические методики для измерения стабильности белка, и они описаны, например, в *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301. Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones. A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993). Стабильность можно измерить при выбранной температуре в течение выбранного периода времени. Стабильность можно оценивать качественно и/или количественно с помощью множества разных способов, включая оценку образования агрегатов (например, с применением эксклюзионной хроматографии, посредством измерения мутности и/или посредством визуального осмотра); посредством оценки неоднородности заряда с применением катионообменной хроматографии, изоэлектрического фокусирования под визуализационным контролем (icIEF) или капиллярного зонного электрофореза; анализа аминоконцевой или карбоксиконцевой последовательности; масс-спектрометрического анализа; анализа посредством SDS-PAGE для сравнения восстановленного и интактного антитела; анализа методом пептидного картирования (например, триптического или с LYS-C); оценки биологической активности или антигенсвязывающей функции антитела и т. п. Нестабильность может предусматривать любые один или несколько из следующих факторов: агрегация, дезамидирование (например, дезамидирование Asn), окисление (например, окисление Met), изомеризация (например, изомеризация Asp), отсечение/гидролиз/фрагментация (например, фрагментация шарнирной области), образование сукцинимиды, неспаренный(неспаренные) цистеин(цистеины), удлинение N-конца, процессинг C-конца, различия в гликозилировании и т. п.

II. Подробное описание

Антитела к CD19

[112] В настоящем изобретении представлено семейство близкородственных антител, которые связываются с человеческим CD19. Антитела из этого семейства содержат набор последовательностей CDR, которые определены в данном документе и показаны в таблице 1, и представлены на примере приведенными последовательностями

CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, изложенными в таблице 2, и последовательностями варибельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 5 и 6, изложенными в таблице 3. Данное семейство антител обеспечивает ряд преимуществ, которые способствуют их применимости в качестве терапевтического(терапевтических) средства(средств) с клинической точки зрения. Антитела предусматривают представителей с рядом значений аффинности связывания, что позволяет выбрать конкретную последовательность с требуемой аффинностью связывания.

[113] Таблица 1. Уникальные аминокислотные последовательности CDR антитела к CD19 на основе тяжелых цепей

SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
GFTFSDYY (SEQ ID NO: 1)	MSSSGSTI (SEQ ID NO: 2)	ARGGIAATGT (SEQ ID NO: 3)
		ARGGIAAAGT (SEQ ID NO: 4)
GFDFSDYY (SEQ ID NO: 38)		
	MSSDGSTI (SEQ ID NO: 39)	

[114] Таблица 2. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 антитела к CD19 на основе тяжелых цепей

ID клона №	SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
370083	GFTFSDYY (SEQ ID NO: 1)	MSSSGSTI (SEQ ID NO: 2)	ARGGIAATGT (SEQ ID NO: 3)
370034	GFTFSDYY (SEQ ID NO: 1)	MSSSGSTI (SEQ ID NO: 2)	ARGGIAAAGT (SEQ ID NO: 4)

[115] Таблица 3. Аминокислотные последовательности варибельного домена антитела к CD19 на основе тяжелых цепей

ID клона №	SEQ_aa_FR1_FR4	SEQ ID NO:
370083	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAP GKGGLEWVSY MSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMTSLRAEDTA VYYCARGGI AATGTWGQGTLVTVSS	5
370034	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAP GKGGLEWVSY	6

	MSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAAKKSLEYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGI AAAGTWGQGTLVTVSS	
T29D	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFDYMSWIRQAP GKGLEWVSY MSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAAKKSLEYLQMNSLRAEDTA VYYCARGGI AAAGTWGQGTLVTVSS	40
S55D	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYMSWIRQAP GKGLEWVSY MSSDGSTIYYADSVKGRFTISRDNAAKKSLEYLQMNSLRAEDT AVYYCARGGI AAAGTWGQGTLVTVSS	41

[116] Подходящее антитело может быть выбрано из антител, представленных в данном документе для разработки и терапевтического или другого применения, включая без ограничения применение в качестве биспецифического антитела или части CAR-T-клеточной структуры, как показано, например, на фиг. 4, панели В.

[117] Определение аффинности к кандидатному белку можно выполнять с применением способов, известных из уровня техники, таких как измерения с помощью *Biacore*. Представители семейства антител могут обладать аффинностью к CD19 с Kd, составляющей от приблизительно 10^{-6} до около приблизительно 10^{-11} , включая без ограничения от приблизительно 10^{-6} до около приблизительно 10^{-10} ; от приблизительно 10^{-6} до около приблизительно 10^{-9} ; от приблизительно 10^{-6} до около приблизительно 10^{-8} ; от приблизительно 10^{-8} до около приблизительно 10^{-11} ; от приблизительно 10^{-8} до около приблизительно 10^{-10} ; от приблизительно 10^{-8} до около приблизительно 10^{-9} ; от приблизительно 10^{-9} до около приблизительно 10^{-11} ; от приблизительно 10^{-9} до около приблизительно 10^{-10} или любое значение в пределах этих диапазонов. Выбор аффинности может быть подтвержден посредством биологической оценки модуляции, например, блокирования, биологической активности CD19, включая анализы *in vitro*, доклинические модели и клинические испытания, а также оценку потенциальной токсичности.

[118] Представители семейства антител, представленного в данном документе, не характеризуются перекрестной реактивностью с белком CD19 яванского макака, но могут быть сконструированы для обеспечения перекрестной реактивности с белком CD19 яванского макака или с CD19 любых других видов животных при необходимости.

[119] Семейство CD19-специфичных антител по данному документу содержит домен VH, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в каркасной области человеческой VH. Последовательности CDR могут быть расположены, например, в области около аминокислотных остатков 26-33; 51-58 и 97-116 для CDR1, CDR2 и CDR3

соответственно предусмотренных в качестве примера последовательностей вариабельной области, изложенных под SEQ ID NO: 5-6. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что последовательности CDR могут находиться в других положениях, если выбрана другая последовательность каркасной области, хотя обычно порядок последовательностей остается одинаковым.

[120] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 содержит последовательность CDR1 под любым из SEQ ID NO: 1 или 38. В конкретном варианте осуществления антитело к CD19 содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1. В конкретном варианте осуществления антитело к CD19 содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 38.

[121] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 содержит последовательность CDR2 под любым из SEQ ID NO: 2 или 39. В конкретном варианте осуществления антитело к CD19 содержит последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2. В конкретном варианте осуществления антитело к CD19 содержит последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 39.

[122] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 содержит последовательность CDR3 под любым из SEQ ID NO: 3-4. В конкретном варианте осуществления антитело к CD19 содержит последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3. В конкретном варианте осуществления антитело к CD19 содержит последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4.

[123] В дополнительном варианте осуществления антитело к CD19, содержащее только тяжелые цепи, содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1; последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3.

[124] В дополнительном варианте осуществления антитело к CD19 содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1; последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4.

[125] В дополнительном варианте осуществления антитело к CD19 содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 38; последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4.

[126] В дополнительном варианте осуществления антитело к CD19 содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1; последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 39 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4.

[127] В дополнительном варианте осуществления антитело к CD19 содержит любую из аминокислотных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 5-6 и 40-41 (таблица 3).

[128] В еще одном дополнительном варианте осуществления антитело к CD19 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 5.

[129] В еще одном дополнительном варианте осуществления антитело к CD19 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 6.

[130] В еще одном дополнительном варианте осуществления антитело к CD19 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 40.

[131] В еще одном дополнительном варианте осуществления антитело к CD19 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 41.

[132] В некоторых вариантах осуществления последовательность CDR в антителе к CD19 по настоящему изобретению содержит одну или две аминокислотные замены относительно последовательности CDR1, CDR2 и/или CDR3 или набора последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 в любой из последовательностей под SEQ ID NO: 1-4, 38 и 39 (таблица 1; таблица 2).

[133] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 предпочтительно содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), в котором последовательность CDR3 характеризуется превышающей или равной 80%, например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности на уровне аминокислот с последовательностью CDR3 любого из антител, последовательности CDR3 которых представлены в таблице 1 или таблице 2, и связывается с CD19.

[134] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 предпочтительно содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), в котором полный набор CDR 1, 2 и 3 (в совокупности) характеризуется превышающей восьмидесятипроцентную (85%) или равной ей идентичностью последовательности на уровне аминокислот с CDR 1, 2 и 3 (в совокупности) антител, последовательности CDR которых представлены в таблице 1 или таблице 2, и связывается с CD19.

[135] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью, по меньшей мере 85% идентичностью, по меньшей мере 90% идентичностью, по меньшей мере 95% идентичностью, по меньшей мере 98% идентичностью или по меньшей мере 99% идентичностью с любой из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 5-6 и 40-41 (показанных в таблице 3), и связывается с CD19.

[136] В некоторых вариантах осуществления представлены биспецифические или полиспецифические антитела, которые могут характеризоваться любой из обсуждаемых в данном документе конфигураций, включая без ограничения биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу (ТСА). В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело может содержать по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, характеризующуюся специфичностью связывания с CD19, и по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, характеризующуюся специфичностью связывания с белком, отличным от CD19. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело может содержать по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая связывается с CD19, и по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи, которая связывается с белком, отличным от

CD19. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело может содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую по меньшей мере два антигенсвязывающих домена, где каждый из антигенсвязывающих доменов связывается с CD19. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело может содержать пару тяжелая цепь/легкая цепь, которая связывается с первым антигеном (например, CD3), и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи. В определенных вариантах осуществления тяжелая цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержит Fc-часть, содержащую домены CH2, и/или CH3, и/или CH4, в отсутствие домена CH1. В одном конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит пару тяжелая цепь/легкая цепь, которая связывается с антигеном на эффекторной клетке (например, белком CD3 на Т-клетке), и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащую антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19.

[137] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело содержит CD3-связывающий домен VH, который образует пару с переменным доменом легкой цепи. В определенных вариантах осуществления легкая цепь представляет собой фиксированную легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен VH содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 7, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 8 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 9 в каркасной области человеческой VH. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен VH содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 10, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 12 в каркасной области человеческой VH. В некоторых вариантах осуществления фиксированная легкая цепь содержит последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 13, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 14 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 15 в каркасной области человеческой VL. CD3-связывающий домен VH и переменный домен легкой цепи вместе характеризуются аффинностью связывания в отношении CD3. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен VH содержит последовательность переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен VH содержит последовательность переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен VH содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью с последовательностью переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 16 или 17. В некоторых вариантах осуществления фиксированная легкая цепь содержит последовательность переменной области легкой цепи под SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления фиксированная легкая цепь содержит последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере

приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью с последовательностью варибельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 18.

[138] Полиспецифические антитела, содержащие описанный выше CD3-связывающий домен VH и варибельный домен легкой цепи, обладают преимущественными свойствами, например, описанными в опубликованной заявке согласно РСТ под номером WO2018/052503, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Любые полиспецифические антитела и антигенсвязывающие домены, описанные в данном документе, характеризующиеся аффинностью связывания в отношении CD19, могут быть объединены с CD3-связывающими доменами и доменами фиксированной легкой цепи, описанными в данном документе (см., например, таблицу 4 и таблицу 5), а также с дополнительными последовательностями, такими как представленные в таблице 6 и таблице 7, с получением полиспецифических антител, характеризующихся аффинностью связывания в отношении одного или нескольких эпитопов CD19, а также CD3.

Таблица 4. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, CDR3 тяжелой и легкой цепей антитела к CD3

	SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
Тяжелая цепь (F2B)	GFTFDDYA (SEQ ID NO: 7)	ISWNSGSI (SEQ ID NO: 8)	AKDSRGYGDYRLGGAY (SEQ ID NO: 9)
Тяжелая цепь (F2F)	GFTFHNYA (SEQ ID NO: 10)	ISWNSGSI (SEQ ID NO: 11)	AKDSRGYGDYSLGGAY (SEQ ID NO: 12)
Легкая цепь	QSVSSN (SEQ ID NO: 13)	GAS (SEQ ID NO: 14)	QQYNNWPWT (SEQ ID NO: 15)

Таблица 5. Аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей антитела к CD3

VH (F2B)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC AKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 16)
VH (F2F)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFHNYAMHWVRQAPGKGLEW VSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC AKDSRGYGDYSLGGAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 17)
VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 18)

Таблица 6. Последовательности Fc-областей человеческих IgG1 и IgG4

<p>Человеческий IgG1 (UniProt № P01857)</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 19)</p>
<p>Человеческий IgG4 (UniProt № P01861)</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 20)</p>
<p>Человеческий IgG1 с сайленсинговыми мутациями (Fc- область)</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 21)</p>
<p>Человеческий IgG4 с сайленсинговыми мутациями (Fc- область)</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 22)</p>

Таблица 7. Дополнительные последовательности

<p>Последовательность константной области легкой цепи антитела к CD3 (легкая каппа-цепь)</p>	<p>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 23)</p>
<p>Последовательность тяжелой цепи антитела к CD3 (VH+Fc IgG1 дикого типа)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQA PGKGLEWVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGTLLTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 24)</p>
<p>Последовательность тяжелой цепи антитела к CD3 (с подвергнутой сайленсингу Fc IgG1)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQA PGKGLEWVSGISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGTLLTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 25)</p>

<p>Последовательность константной области тяжелой цепи антитела к CD3 (с Fc IgG4 дикого типа)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQA PGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 26)</p>
<p>Последовательность константной области тяжелой цепи антитела к CD3 (с подвергнутой сайленсингу Fc IgG4)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQA PGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 27)</p>
<p>Подвергнутый сайленсингу IgG4 (шарнир - CH2 - CH3; впадина (S228P, F234A, L235A; T366S, L368A, Y407V))</p>	<p>ESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 28)</p>

<p>Подвергнутый сайленсингу IgG4 (шарнир - CH2 - CH3; выступ (S228P, F234A, L235A; T366W))</p>	<p>ESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 29)</p>
<p>Полноразмерная легкая цепь антитела к CD3 (VL+CL каппа)</p>	<p>EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVY YCQQYNNWPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO: 30)</p>
<p>Полноразмерная тяжелая цепь антитела к CD3 (VH+подвергнутая сайленсингу Fc IgG4+выступ (S228P, F234A, L235A; T366W))</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQA PGKGLEWVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 31)</p>
<p>Моновалентная тяжелая цепь антитела к CD19 (ID клона 370083) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V)</p>	<p>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAP GKGLEWVSYMSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MTSLRAEDTAVYYCARGGIAATGTWGQGLTVTVSSESKYG PPCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 32)</p>

<p>Бивалентная тяжелая цепь антитела к CD19 (ID клона 370083) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V)</p>	<p>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAP GKGLEWVSYMSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MTSLRAEDTAVYYCARGGIAATGTWGQGLTLTVSSGGGGS GGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYMSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNANK NSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARGGIAATGTWGQGLTLTVS SESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRITVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 33)</p>
<p>Моновалентная тяжелая цепь антитела к CD19 (ID клона 370034) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V)</p>	<p>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAP GKGLEWVSYMSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNANKKSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGGIAAAGTWGQGLTLTVSSESKYGP PPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYITLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRITVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 34)</p>
<p>Бивалентная тяжелая цепь антитела к CD19 (ID клона 370034) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V)</p>	<p>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAP GKGLEWVSYMSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNANKKSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGGIAAAGTWGQGLTLTVSSGGGGS GGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYMSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNANK KSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGIAAAGTWGQGLTLTVS SESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRITVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 35)</p>

<p>Бивалентная тяжелая цепь антитела к CD19 (ID клона 370083 x ID клона 370034) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V)</p>	<p>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAP GKGLEWVSYMSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MTSLRAEDTAVYYCARGGIAATGTWGQGLTVTVSSGGGGGS GGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYMSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK KSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGIAAAGTWGQGLTVTVS SESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGFFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 36)</p>
<p>Бивалентная тяжелая цепь антитела к CD19 (ID клона 370034 x ID клона 370083) + подвергнутая сайленсингу Fc IgG4, впадина (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V)</p>	<p>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAP GKGLEWVSYMSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGGIAAAGTWGQGLTVTVSSGGGGGS GGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYMSSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARGGIAATGTWGQGLTVTVS SESKYGPPCPPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGFFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 37)</p>

[139] В некоторых вариантах осуществления представлены биспецифические или полиспецифические антитела, которые могут характеризоваться любой из обсуждаемых в данном документе конфигураций, включая без ограничения биспецифическую трехцепочечную антителоподобную молекулу (ТСА). В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело может содержать по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая связывается с CD19, и по меньшей мере одну переменную область тяжелой цепи, которая связывается с белком, отличным от CD19. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело может содержать пару тяжелая цепь/легкая цепь, которая связывается с первым антигеном, и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащую Fc-часть, содержащую домены CH2, и/или CH3, и/или CH4, в отсутствие домена CH1, и антигенсвязывающий домен, который связывает эпитоп второго антигена или другой

эпитоп первого антигена. В одном конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит пару тяжелая цепь/легкая цепь, которая связывается с антигеном на эффекторной клетке (например, белком CD3 на Т-клетке), и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащую антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19.

[140] В некоторых вариантах осуществления, если антитело по настоящему изобретению является биспецифическим антителом, одно плечо антитела (один связывающий фрагмент или одна связывающая единица) является специфичным в отношении человеческого CD19, в то время как другое плечо может быть специфичным в отношении клеток-мишеней, опухолеассоциированных антигенов, нацеливающих антигенов, например, интегринов и т. д., антигенов патогенов, белков контрольных точек иммунного ответа и т. п. Клетки-мишени конкретно включают раковые клетки, в том числе без ограничения клетки, ассоциированные с гематологическими злокачественными опухолями, характеризующиеся экспрессией CD19, а также патогенные В-клетки, ассоциированные с аутоиммунными нарушениями, характеризующиеся экспрессией CD19. В некоторых вариантах осуществления одно плечо антитела (один связывающий фрагмент или одна связывающая единица) является специфичным в отношении человеческого CD19, тогда как другое плечо является специфичным в отношении CD3.

[141] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит полипептид легкой цепи антитела к CD3, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 30, полипептид тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 16 или 17, и полипептид тяжелой цепи антитела к CD19, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 5 или 6, в моновалентной или бивалентной конфигурации, связанный с последовательностью под любым из SEQ ID NO: 28 или 29. Эти последовательности можно объединять различными способами для получения биспецифического антитела требуемого подкласса IgG, например, IgG1, IgG4, подвергнутого сайленсингу IgG1, подвергнутого сайленсингу IgG4. В одном предпочтительном варианте осуществления антитело представляет собой TCA, содержащую первый полипептид, содержащий SEQ ID NO: 30, второй полипептид, содержащий SEQ ID NO: 31, и третий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36 или 37.

[142] В объем настоящего изобретения входят различные форматы полиспецифических антител, включая без ограничения одноцепочечные полипептиды, двухцепочечные полипептиды, трехцепочечные полипептиды, четырехцепочечные полипептиды и их множества. Полиспецифические антитела по данному документу, в частности, включают Т-клеточные полиспецифические (например, биспецифические) антитела, связывающиеся с CD19 и CD3 (антитела к CD19 и к CD3). Такие антитела индуцируют эффективное опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих CD19.

Получение антител к CD19

[143] Антитела по настоящему изобретению могут быть получены посредством способов, известных из уровня техники. В предпочтительном варианте осуществления антитела по данному документу продуцируются трансгенными животными, в том числе трансгенными мышами и крысами, предпочтительно крысами, у которых нокаутированы или блокированы эндогенные гены иммуноглобулинов. В предпочтительном варианте осуществления антитела на основе тяжелых цепей по данному документу продуцируются в UniRatTM. UniRatTM характеризуются их подвергнутыми сайленсингу эндогенными генами иммуноглобулина, и в них используется трансгенный локус тяжелой цепи иммуноглобулина человека для экспрессии разнообразного, оптимизированного естественным путем спектра полностью человеческих HCAb. В то время как эндогенные локусы иммуноглобулинов у крыс можно нокаутировать или подвергать сайленсингу с применением различных технологий, в UniRatTM для инактивации эндогенного крысиного J-локуса тяжелой цепи, Сκ-локуса легкой цепи и Сλ-локуса легкой цепи применяли технологии с использованием (эндо)нуклеазы с цинковыми пальцами (ZNF). Конструкции ZNF для микроинъекций в ооциты могут приводить к получению линий, характеризующихся нокаутом IgH и IgL (KO). Подробнее см., например, Geurts et al., 2009, Science 325:433. Определение характеристик крыс с нокаутом тяжелой цепи Ig описано у Menoret et al., 2010, Eur. J. Immunol. 40:2932-2941. Преимущества технологии с использованием ZNF заключаются в том, что негомологичное соединение концов для сайленсинга гена или локуса посредством делеций до нескольких т. о. также может обеспечить сайт-мишень для гомологичной интеграции (Cui et al., 2011, Nat Biotechnol 29:64-67). Человеческие антитела на основе тяжелых цепей, продуцируемые в UniRatTM, называются UniAbsTM и могут связывать эпитопы, которые не могут быть атакованы обычными антителами. Их высокая специфичность, аффинность и небольшой размер делают их идеальными для моно- и полиспецифических вариантов применения.

[144] В дополнение к UniAbsTM, в данный документ конкретно включены антитела, содержащие только тяжелые цепи, без каркасной области и мутаций VHH верблюдовых и их функциональные области VH. Такие антитела, содержащие только тяжелые цепи, могут продуцироваться, например, в трансгенных крысах или мышах, которые содержат полностью человеческие локусы генов только тяжелых цепей, как описано, например, в WO 2006/008548, однако другие трансгенные млекопитающие, такие как кролик, морская свинка, крыса, также могут быть использованы, при этом крысы и мыши являются предпочтительными. Антитела, содержащие только тяжелые цепи, в том числе их функциональные фрагменты VHH или VH, также могут продуцироваться с помощью технологии рекомбинантной ДНК посредством экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты в подходящем эукариотическом или прокариотическом хозяине, в том числе, например, клетках млекопитающих (например, клетках CHO), E. coli или дрожжах.

[145] Домены антител, содержащих только тяжелые цепи, сочетают в себе преимущества антител и низкомолекулярных лекарственных средств: могут быть моно- или поливалентными; характеризуются низкой токсичностью и рентабельны в

изготовлении. Благодаря своему небольшому размеру эти домены легко вводятся, включая пероральное или местное введение, характеризуются высокой стабильностью, включая стабильность в желудочно-кишечном тракте, и их период полувыведения можно адаптировать к требуемому применению или показанию. Кроме того, домены VH и VHH HCAb могут быть изготовлены посредством рентабельного способа.

[146] В конкретном варианте осуществления антитела на основе тяжелых цепей по настоящему изобретению, в том числе UniAbsTM, характеризуются нативным аминокислотным остатком в первом положении области FR4 (аминокислотное положение 101 в соответствии с системой нумерации согласно Kabat), замещенным другим аминокислотным остатком, который способен нарушить доступный на поверхности гидрофобный участок, содержащий нативный аминокислотный остаток в этом положении или ассоциированный с ним. Такие гидрофобные участки обычно скрыты на поверхности границы взаимодействия с константной областью легкой цепи антитела, однако становятся доступными на поверхности в HCAb и по меньшей мере частично служат для нежелательной агрегации и ассоциации легких цепей HCAb. Замещенный аминокислотный остаток предпочтительно заряжен и более предпочтительно заряжен положительно, такой как лизин (Lys, K), аргинин (Arg, R) или гистидин (His, H), предпочтительно аргинин (R). В предпочтительном варианте осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, полученные от трансгенных животных, содержат мутацию замены Trp на Arg в положении 101. Полученные HCAb предпочтительно характеризуются высокой антигенсвязывающей аффинностью и растворимостью в физиологических условиях при отсутствии агрегации.

[147] В качестве части настоящего изобретения были идентифицированы человеческие антитела IgG к CD19 на основе тяжелых цепей с уникальными последовательностями от животных UniRatTM (UniAbTM), которые связываются с человеческим CD19 в анализах связывания белка и клеток на основе ELISA. Идентифицированные последовательности вариabельной области тяжелой цепи (VH) являются положительными в отношении связывания человеческого белка CD19 и/или в отношении связывания с CD19+ клетками, и все они являются отрицательными в отношении связывания с клетками, которые не экспрессируют CD19.

[148] Антитела на основе тяжелых цепей, связывающиеся с неперекрывающимися эпитопами на белке CD19, например, UniAbTM, можно идентифицировать посредством анализов конкурентного связывания, таких как иммуноферментные анализы (анализы ELISA) или анализы конкурентного связывания на основе проточной цитометрии. Например, можно применять конкуренцию между известными антителами, связывающимися с антигеном-мишенью, и антителом, представляющим интерес. С применением этого подхода можно разделить набор антител на те, которые конкурируют с референтным антителом, и те, которые не конкурируют с ним. Неконкурирующие антитела идентифицируют как связывающиеся с отдельным эпитопом, который не перекрывается с эпитопом, связанным с референтным антителом. Часто одно антитело

иммобилизуют, антиген связывают, и второе меченое (например, биотинилированное) антитело исследуют в анализе ELISA в отношении способности связывать захваченный антиген. Это также может быть выполнено с применением платформ поверхностного плазмонного резонанса (SPR), в том числе ProteOn XPR36 (BioRad, Inc), Biacore 2000 и Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences) и сканера изображений MX96 SPR (Ibis Technologies B.V.), а также на платформах биослойной интерферометрии, таких как Octet Red384 и Octet HTX (ForteBio, Pall Inc). Для получения дополнительной подробной информации см. примеры в данном документе.

[149] Как правило, антитело "конкурирует" с референтным антителом, если оно вызывает приблизительно 15-100% уменьшение связывания референтного антитела с антигеном-мишенью, что определяется стандартными методиками, такими как описанные выше анализы конкурентного связывания. В различных вариантах осуществления относительное подавление составляет по меньшей мере приблизительно 15%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или больше.

Фармацевтические композиции, варианты применения и способы лечения

[150] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько антител по настоящему изобретению в смеси с подходящим фармацевтически приемлемым носителем. Примерами фармацевтически приемлемых носителей, применяемых в данном документе, являются без ограничения адьюванты, твердые носители, вода, буферы или другие носители, применяемые в данной области техники для хранения терапевтических компонентов, или их комбинации.

[151] В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело на основе тяжелых цепей (например, UniAbTM), которое связывается с CD19. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит полиспецифическое (включая биспецифическое) антитело на основе тяжелых цепей (например, UniAbTM) со специфичностью связывания в отношении двух или более неперекрывающихся эпитопов на белке CD19. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит полиспецифическое (включая биспецифическое и ТСА) антитело на основе тяжелых цепей (например, UniAbTM) со специфичностью связывания с CD19 и со специфичностью связывания с мишенью связывания на эффекторной клетке (например, мишенью связывания на Т-клетке, такой как, например, белок CD3 на Т-клетке). В предпочтительном варианте осуществления

фармацевтическая композиция содержит полиспецифическое (включая биспецифическое и ТСА) антитело на основе тяжелых цепей (например, UniAbTM), которое связывается с CD19 и которое связывается с мишенью связывания на эффекторной клетке (например, мишенью связывания на Т-клетке, такой как, например, белок CD3 на Т-клетке).

[152] Фармацевтические композиции антител, применяемых в соответствии с настоящим изобретением, получают для хранения путем смешивания белков, характеризующихся требуемой степенью чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), например, в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при применяемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид, гексаметония хлорид, бензалкония хлорид, бензетония хлорид, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (менее чем приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок) и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEENTM, PLURONICTM или полиэтиленгликоль (PEG).

[153] Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно являются стерильными и по сути изотоническими и изготавливаются в соответствии с условиями надлежащей производственной практики (GMP). Фармацевтические композиции могут быть предусмотрены в виде стандартной лекарственной формы (т. е. дозировки для однократного введения). Состав зависит от выбранного пути введения. Антитела по данному документу можно вводить посредством внутривенной инъекции или инфузии или подкожно. Для инъекционного введения антитела по данному документу могут быть составлены в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах для уменьшения дискомфорта в месте инъекции. Раствор может содержать носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы, как обсуждается выше. В качестве альтернативы антитела могут находиться в лиофилизированной форме для разбавления подходящей средой-носителем, например, стерильной апиrogenной водой, перед применением.

[154] Составы на основе антител раскрыты, например, в патенте США № 9034324.

Подобные составы можно применять в случае антител на основе тяжелых цепей, включая UniAbsTM, по настоящему изобретению. Составы на основе антител для подкожного применения введения, описаны, например, в US20160355591 и US20160166689.

Способы применения

[155] Антитела к CD19 и фармацевтические композиции, описанные в данном документе, можно применять для лечения заболеваний и состояний, характеризующихся экспрессией CD19, включая без ограничения состояния и заболевания, описанные далее в данном документе.

[156] CD19 представляет собой рецептор клеточной поверхности, экспрессирующийся на всех В-клетках человека, но не обнаруживаемый на плазматических клетках. Он имеет относительно большой цитоплазматический "хвост" из 240 аминокислот. Внеклеточные Ig-подобные домены разделены потенциально стабилизированным дисульфидными связями не-Ig-подобным доменом и сайтами N-связанного присоединения углеводов. Цитоплазматический "хвост" содержит по меньшей мере девять остатков тирозина вблизи С-конца, некоторые из которых, как было показано, являются фосфорилированными. Наряду с CD20 и CD22, экспрессия CD19, ограниченная В-клеточной линией дифференцировки, делает его привлекательной мишенью для терапевтического лечения В-клеточных злокачественных опухолей. Ввиду его наблюдаемой экспрессии в ряде гематологических злокачественных опухолей CD19 является перспективной мишенью для терапевтических средств на основе антител.

[157] В одном аспекте антитела к CD19 (например, UniAbsTM) и фармацевтические композиции по данному документу можно применять для лечения нарушений, характеризующихся экспрессией CD19, включая без ограничения заболевания и нарушения, описанные далее в данном документе.

[158] Антитела к CD19, содержащие только тяжелые цепи (UniAbs), по настоящему изобретению можно применять для разработки терапевтических средств для лечения гематологических злокачественных опухолей, характеризующихся экспрессией CD19, включая без ограничения диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), неходжкинскую лимфому, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (ALL).

[159] Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL or DLBL) является наиболее распространенной формой неходжкинской лимфомы среди взрослых (Blood 1997 89 (11): 3909-18), при этом оценочная годовая частота возникновения составляет 7-8 случаев на 100000 человек в год в США и Великобритании. Она характеризуется как агрессивный рак, который может возникнуть практически в любой части организма. Причины DLBCL не являются хорошо известными, и она может возникать из нормальных В-клеток, а также в результате злокачественной трансформации других типов клеток лимфомы или лейкозных клеток. Подходы к лечению в целом предусматривают химиотерапию и облучение и приводили к коэффициенту общей пятилетней выживаемости, составляющему в среднем примерно 58% для взрослых. Хотя

некоторые моноклональные антитела показали перспективу для лечения DLBCL, устойчивая клиническая эффективность еще не была убедительно продемонстрирована. Следовательно, существует большая потребность в новых видах терапии, включая виды иммунотерапии, для DLBCL.

[160] В другом аспекте антитела к CD19 на основе тяжелых цепей (например, UniAbsTM) и фармацевтические композиции по данному документу можно применять для лечения аутоиммунных нарушений, характеризующихся наличием патогенных В-клеток, которые экспрессируют CD19, включая без ограничения системную красную волчанку (SLE), ревматоидный артрит (RA) и рассеянный склероз (MS).

[161] В одном варианте осуществления антитела по данному документу могут находиться в форме CAR-структур на основе антитела к CD19, содержащего только тяжелые цепи, т. е. Т-клеточных структур, трансдуцированных с помощью CAR на основе антитела к CD19, содержащего только тяжелые цепи.

[162] Эффективные дозы композиций по настоящему изобретению для лечения заболевания варьируются в зависимости от многих разных факторов, в том числе способа введения, участка-мишени, физиологического состояния пациента, того, является ли пациент человеком или животным, других вводимых лекарственных препаратов и того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациентом является человек, но также можно лечить отличных от человека млекопитающих, например, домашних животных, таких как собаки, кошки, лошади и т. д., лабораторных млекопитающих, таких как кролики, мыши, крысы и т. д., и т. п. Лечебные дозировки можно подбирать для оптимизации безопасности и эффективности.

[163] Уровни дозировки могут быть легко определены обычным квалифицированным клиницистом и могут быть модифицированы по мере необходимости, например, по мере необходимости для модифицирования ответа субъекта на средство терапии. Количество активного ингредиента, которое можно объединять с материалами-носителями для получения единичной лекарственной формы, варьируется в зависимости от хозяина, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Стандартные лекарственные формы обычно содержат от приблизительно 1 мг до приблизительно 500 мг активного ингредиента.

[164] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая дозировка средства может находиться в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и чаще от 0,01 до 5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозировки могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или находиться в диапазоне, составляющем 1-10 мг/кг. Иллюстративная схема лечения предусматривает введение один раз в две недели, или один раз в месяц, или один раз каждые 3-6 месяцев. Терапевтические средства по настоящему изобретению обычно вводят многократно. Интервалы между однократными дозировками могут составлять неделю, месяц или год. Интервалы также могут быть нерегулярными, на что указывает измерение уровней терапевтического средства в крови пациента. В качестве альтернативы терапевтические средства по настоящему изобретению

можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируют в зависимости от периода полувыведения полипептида у пациента.

[165] Обычно композиции получают в виде форм для инъекций - либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий; также могут быть получены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких средах-носителях перед инъекцией. Фармацевтические композиции по данному документу являются подходящими для внутривенного или подкожного введения, непосредственно или после растворения твердых (например, лиофилизированных) композиций. Препарат также может быть эмульгирован или инкапсулирован в липосомы или микрочастицы, такие как полилактид, полигликолид или сополимер, для усиления адьювантного эффекта, как обсуждается выше. Langer, *Science* 249: 1527, 1990 и Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28: 97-119, 1997. Средства по настоящему изобретению можно вводить в форме препарата для депо-инъекций или препарата для имплантации, который может быть составлен таким образом, чтобы обеспечить замедленное или пульсирующее высвобождение активного ингредиента. Фармацевтические композиции обычно составляют стерильными, по сути изотоническими и в полном соответствии со всеми правилами надлежащей производственной практики (GMP) Управления США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов.

[166] Токсичность антител и структур антител, описанных в данном документе, можно определить стандартными фармацевтическими процедурами в культурах клеток или с помощью экспериментальных животных, например, посредством определения LD50 (дозы, летальной для 50% популяции) или LD100 (дозы, летальной для 100% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектом представляет собой терапевтический индекс. Данные, полученные в результате этих анализов культур клеток и исследований с применением животных, можно применять для определения диапазона дозировок, который является нетоксичным для применения у людей. Дозировка антител, описанных в данном документе, предпочтительно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включает эффективную дозу с незначительной токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. Точный состав, путь введения и дозировка могут быть выбраны лечащим врачом с учетом состояния пациента.

[167] Композиции для введения обычно будут содержать антитело или другое аблятивное средство, растворенное в фармацевтически приемлемом носителе, предпочтительно водном носителе. Можно применять различные водные носители, например, забуференный солевой раствор и т. п. Эти растворы являются стерильными и обычно не содержат нежелательных веществ. Эти композиции можно стерилизовать посредством обычных, хорошо известных методик стерилизации. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как средства, регулирующие pH, и

буферные средства, средства, регулирующие токсичность, и т. п., например, ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, лактат натрия и т. п. Концентрация активного средства в этих составах может варьироваться в широких пределах и будет выбрана в первую очередь исходя из объемов жидкости, вязкости, массы тела и т. п. в соответствии с выбранным конкретным способом введения и потребностями пациента (например, Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., 1980) и Goodman & Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman et al., eds., 1996)).

[168] Также в объем настоящего изобретения входят наборы, содержащие активные средства и содержащие их составы по настоящему изобретению, а также инструкции по применению. Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный реагент, например, химиотерапевтическое лекарственное средство и т. п. Наборы обычно включают этикетку, указывающую на целевое применение содержимого набора. Термин "этикетка", используемый в данном документе, предусматривает любой письменный или записанный материал, поставляемый в наборе или вместе с набором или иным образом сопровождающий набор.

[169] Настоящее изобретение в данном документе полностью описано, и специалисту в данной области техники будет очевидно, что различные изменения и модификации могут быть выполнены без отклонения от сути или объема изобретения.

III. Примеры

Пример 1. Связывание с CD19+ клетками Raji

[170] Связывание с CD19-положительными клетками Raji оценивали посредством проточной цитометрии. Вкратце, 50000 клеток-мишеней окрашивали с помощью серии разведений очищенных UniAbsTM в течение 30 минут при 4°C. После инкубации клетки промывали дважды с помощью буфера для проточной цитометрии (1X PBS, 1% BSA, 0,1% NaN₃) и окрашивали с помощью козьего F(ab')₂ к человеческому IgG, конъюгированного с R-фикоэритрином (PE) (Southern Biotech, № по кат. 2042-09) для выявления антител, связанных с клетками. После 20-минутной инкубации при 4°C клетки промывали дважды с помощью буфера для проточной цитометрии, и измеряли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) посредством проточной цитометрии. MFI клеток, окрашенных только вторичным антителом, использовали для определения фонового сигнала, и связывание каждого антитела преобразовывали в кратность относительно фонового значения.

[171] Результаты представлены на фиг. 1, на которой обобщена активность связывания мишени у указанных антител к CD19. В столбце 1 указан ID клона HCAb. В столбце 2 указано связывание с клетками Raji, измеренное в виде кратности относительно MFI фонового сигнала. В столбце 3 показано связывание с клетками CHO, которые не экспрессируют белок CD19 (отрицательный контроль), измеренное в виде кратности относительно MFI фонового сигнала.

Пример 2. Связывание с CD19+ клетками Raji и Daudi

[172] Дозовые кривые связывания с клетками строили с использованием двух

линий клеток: Raji (A) и Daudi (B), как описано в примере 1. Антитела тестировали в начальной концентрации 200 нМ с последующими 3-кратными серийными разведениями с получением дозовой кривой по 8 точкам. Среднюю интенсивность флуоресценции PE представляли графически в виде кратности относительно фонового значения (клетки инкубировали только со вторичным детекторным антителом).

[173] Результаты представлены на фиг. 2, панели A (клетки Raji) и панели B (клетки Daudi).

Пример 3. Значения EC50 при связывании с клетками в CD19+ линиях клеток

[174] Для определения значений EC50 при связывании с клетками строили дозовые кривые связывания с клетками с использованием линий клеток Raji и Daudi, экспрессирующих CD19, как описано в примере 2. Антитела тестировали в начальной дозе 200 нМ с последующими 3-кратными серийными разведениями с получением дозовой кривой по 8 точкам. Преобразованные данные представляли графически в виде XY-графика с применением подбора кривой методом нелинейной регрессии (доступного в GraphPad Prism 8.4.3) с получением значений EC50 (нМ).

[175] Результаты представлены на фиг. 3.

Пример 4. Опосредованная CAR-T активация Т-клеток линиями опухолевых клеток человека

[176] Активность CAR-T-клеток измеряли путем котрансфекции клеток Т-лимфоцитов Jurkat с помощью CAR для CD19 и люциферазного репортера 6x NFAT TK Nano. Трансфицированные клетки Jurkat совместно культивировали в течение 24 часов с CD19+ клетками Raji, Ramos и SU-DHL-10 или CD19-отрицательными клетками K562. Активность люциферазы измеряли с применением системы анализа люциферазы Promega Nano-Glo (№ по каталогу N1110), и данные нормализовали для совместной культуры, содержащей трансфицированные с помощью CAR линии клеток Jurkat и CD19-отрицательные линии клеток K562. Статистическую значимость определяли с применением непарного двустороннего t-критерия.

[177] Результаты представлены на фиг. 4, панелях B и C.

[178] На фиг. 4, панели A, представлена схематическая иллюстрация CAR-T-клеточной структуры, содержащей внеклеточный связывающий домен для CD19, содержащий последовательность антитела в соответствии с аспектами настоящего изобретения. На панели B изображена активность Т-клеток в отношении клеток Jurkat, трансфицированных с помощью CAR для CD19 370034, с Raji (**p=0,0055), Ramos (**p=0,0058) и SU-DHL-10 (***p=0,00025). На панели C изображена активность Т-клеток в отношении клеток Jurkat, трансфицированных с помощью CAR для CD19 370083, с Raji (****p=0,000009), Ramos (**p=0,004) и SU-DHL-10 (*p=0,016).

Пример 5. Получение связывающих средств VH для CD19, демонстрирующих усиленные биологические свойства, посредством сайт-насыщенного мутагенеза

[179] В этом примере применяли сайт-насыщенный мутагенез для получения пула уникальных CD19-связывающих последовательностей VH, в котором последовательность,

кодирующую аминокислоту дикого типа, систематически замещали одной из последовательностей, кодирующих другие 19 аминокислот, с получением пула мутантных форм, которые могут быть подвергнуты скринингу для идентификации связывающих средств VH для CD19 с улучшенными свойствами *in vitro* и/или *in vivo* по сравнению с исходным связывающим средством VH.

[180] Связывающее средство VH для CD19 VH-034 содержит три определяющие комплементарности области ("CDR"): CDR1 (8 аминокислот; SEQ ID NO: 1), CDR2 (8 аминокислот; SEQ ID NO: 2) и CDR3 (10 аминокислот; SEQ ID NO: 4). Сайт-насыщенный мутагенез использовали для систематической замены каждой из объединенных 26 аминокислот CDR одним из других 19 остальных аминокислотных остатков, не относящихся к дикому типу, с получением библиотеки из 513 уникальных последовательностей связывающих средств VH для CD19, содержащих единственную аминокислотную замену в CDR, охватывающую все три последовательности CDR.

[181] Вкратце, нуклеотидная последовательность, кодирующая VH-034, служила в качестве ДНК-матрицы для сайт-насыщенного мутагенеза (например, Chronopoulou and Labrou (2011) *Curr Protocol Protein Sci* Chapter 26 doi: 10.1002/0471140864.ps2606s63). Посредством применения ПЦР и вырожденных синтетических олигонуклеотидов в качестве праймеров один кодон был замещен всеми 20 аминокислотными кодонами в одной и той же реакции, которую затем систематически применяли к каждому из 26 кодонов CDR. Оставшийся пул нуклеиновых кислот из 513 представителей, каждый из которых кодирует одну аминокислотную замену, и исходную последовательность дикого типа клонировали в вектор Nanoplasmid, и частоту встречаемости каждой из 513 уникальных последовательностей связывающих средств VH в плазмидном пуле определяли посредством секвенирования нового поколения (NGS).

[182] Вектор Nanoplasmid nPBv2-EF1a-iC9-CD19.VH034-DHFR содержит следующие элементы в направлении 5'-3': правый концевой ITR - 5'-UTR - инсультатор - промотор EF1a - индуцируемый ген iCaspase9 - T2A - лидерный пептид CD8a - сайт для связывающего средства VH034 - кассета CAR CD19BBZ - T2A - селективируемый маркер DHFR - поли(A) SV40 - инсультатор - 3'-UTR и левый концевой ITR. Каждую уникальную последовательность связывающего средства клонировали внутрирамочно в кассету CAR CD19BBZ с получением полноразмерного CAR (связывающее средство VH для CD19-шарнир CD28-трансмембранный домен 41-BB и домен CD3-дзета) под контролем промотора EF1a.

Пример 6. Получение пула Т-клеток, экспрессирующих CAR, содержащих мутантные связывающие средства VH для CD19

[183] В данном примере получали Т-клеточный пул отдельных Т-клеток, экспрессирующих CAR, содержащие одну из 513 последовательностей связывающих средств VH для CD19.

[184] Пул Т-клеток, содержащий библиотеку из 513 Nanoplasmid со связывающими средствами VH для CD19, полученную в примере 5, получали путем электропорации Т-

клеток с использованием мРНК, кодирующей транспозазу Super piggyBac, и аликвоты пула ДНК Nanoplasmid с низким числом копий ДНК для обеспечения того, что подвергнутые электропорации Т-клетки содержат только одну копию одной из 513 Nanoplasmid. Популяцию подвергнутых электропорации Т-клеток инкубировали в 250 нМ метотрексата для отбора Т-клеток с транспозонами, содержащими интегрированную геномную копию транспозона, экспрессирующего CAR. Частоту встречаемости каждой из 513 уникальных последовательностей связывающих средств в пуле Т-клеток определяли посредством NGS.

Пример 7. Обогащение Т-клетками, экспрессирующими CAR, содержащий связывающее средство VH для CD19, демонстрирующее улучшенное связывание, посредством повторной стимуляции с помощью CD19

[185] В данном примере иллюстрируется, что популяция Т-клеток может быть обогащена выбранными клонами Т-клеток посредством повторного воздействия антигена и отбора клонов Т-клеток, которые преимущественно увеличиваются в количестве вследствие антигенной стимуляции.

[186] В одном эксперименте в многолуночных планшетах Grex-6M примерно 20×10^6 Т-клеток/лунка из Т-клеток из пула Т-клеток, полученного в примере 6, добавляли в каждую лунку в двух наборах. К одному набору добавляли 2×10^6 клеток RAJI (CD19+), а к другому набору добавляли 2×10^6 контрольных клеток RAJI, характеризующихся неактивным геном CD19 (RAJI KO), для стимуляции активации Т-клеток, экспрессирующих CAR для CD19. Для Т-клеток проводили повторную провокационную пробу с 2×10^6 клеток RAJI или RAJI KO соответственно в дни 3, 6, 9. Спустя 12 дней размножение неотсортированного пула Т-клеток, стимулированного клетками RAJI, было примерно 20-кратным, тогда как при использовании клеток RAJI KO наблюдали размножение от незначительного до отсутствующего.

[187] CD19+ клетки анализировали посредством NGS для определения частоты встречаемости каждой из 513 последовательностей мутантных связывающих средств в популяции размножившихся CD19+ Т-клеток, и данную частоту встречаемости каждого представителя анализировали по сравнению с исходными популяциями плазмид и пула Т-клеток.

[188] Во втором эксперименте пул Т-клеток, полученный в примере 6, обрабатывали с помощью кроличьего антитела к человеческому IgG для захвата CAR-положительных клеток, и CAR-клетки сортировали и анализировали посредством FACS-анализа. Отсортированный пул CAR-положительных Т-клеток затем подвергали повторной стимуляции CD19+ клетками RAJI или RAJI-KO, и спустя 15 дней (6 стимуляций клетками RAJI) наблюдали примерно 40-кратное размножение Т-клеток. CAR+ Т-клетки анализировали посредством NGS для определения частоты встречаемости каждой из 513 последовательностей мутантных связывающих средств в популяции размножившихся CAR+ Т-клеток, и данную частоту встречаемости каждого представителя анализировали по сравнению с исходными популяциями плазмид и пула Т-

клеток.

[189] Посредством сравнения относительной частоты встречаемости каждого связывающего средства VH в исходной популяции плазмид, пуле Т-клеток и в каждом из двух условий обогащения можно определить относительное изменение в частоте встречаемости каждой последовательности связывающего средства VH. Большинство из 513 последовательностей связывающих средств VH характеризовались обедненностью в пулах Т-клеток, обработанных с помощью RAJI, что позволяет предположить, что эти мутации были пагубными в отношении связывания CD19, тогда как частота встречаемости доли последовательностей связывающих средств VH оставалась относительно неизменной при стимуляции с помощью CD19, что позволяет предположить, что введенные мутации могли оказывать незначительный эффект в отношении связывания CD19. В результате стимуляции с помощью CD19 происходило обогащение определенными клонами Т-клеток, при этом в двух анализах обогащения были получены перекрывающиеся перечни клонов Т-клеток, которые, по-видимому, были обогащенными в обоих анализах.

[190] Двенадцать лучших связывающих средств VH, наблюдаемых в обоих анализах обогащения, дополнительно анализировали. Два конкретных клона Т-клеток характеризовались высокой обогащенностью в популяции Т-клеток после повторной стимуляции с помощью клеток RAJI. Первый клон Т-клеток содержал CAR, экспрессирующий связывающее средство VH для CD19, содержащее мутацию T29D в CDR1 (SEQ ID NO: 38), а второй клон Т-клеток содержал CAR, экспрессирующий связывающее средство VH для CD19, содержащее мутацию S55D в CDR2 (SEQ ID NO: 39).

[191] У двух обогащенных связывающих средств для CD19 VH T29D и S55D дополнительно определяли характеристики в анализах *in vitro* и *in vivo*.

Пример 8. Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающие средства VH T29D или S55D, демонстрируют усиленную цитотоксичность *in vitro*

[192] В данном примере иллюстрируется, что Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающее средство VH T29D или связывающее средство VH S55D, демонстрируют более высокие уровни цитотоксичности *in vitro* в отношении клеток, экспрессирующих CD19, по сравнению с исходным связывающим средством VH034. На фиг. 5, панелях А и В, представлены графики, на которых показаны сравнительные результаты исследования цитотоксичности *in vitro* для Т-клеток, экспрессирующих CAR, содержащий связывающее средство VH T29D либо связывающее средство VH S55D, по сравнению с исходным связывающим средством VH-034. Более конкретно, результаты демонстрируют цитотоксичность *in vitro* при стимуляции с помощью CD19 с применением клеток Nalm6 (см. фиг. 5, панель А) или RAJI (см. фиг. 5, панель В) по сравнению с исходным связывающим средством VH-034.

[193] В 96-луночном планшете примерно 20000 Т-клеток/луночка из Т-клеток, экспрессирующих CAR, содержащий исходное связывающее средство VH-034,

связывающее средство VH T29D или связывающее средство VH S55D, добавляли в каждую лунку в двух наборах. К одному набору добавляли 10000 клеток RAJI-GFP, а к другому набору добавляли 10000 клеток Nalm6-GFP для стимуляции активации клеток, экспрессирующих CAR для CD19. Для Т-клеток проводили повторную провокационную пробу с 30000 RAJI-GFP или Nalm6-GFP соответственно через 48 ч., через 116 ч. и 172 ч. Цитотоксичность *in vitro* измеряли в режиме реального времени в течение периода 252 (для Nalm6-GFP) или 188 (для RAJI-GFP) часов на Incucyte.

Пример 9. Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающие средства VH T29D или S55D, демонстрируют улучшенную активацию Т-клеток *in vitro*

[194] В данном примере иллюстрируется, что Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающие средства VH для CD19, обогащенные посредством стимуляции с помощью CD19, демонстрируют более высокие уровни активации Т-клеток *in vitro* по сравнению с исходным связывающим средством VH034.

[195] На фиг. 6 показана таблица, в которой обобщена улучшенная активация Т-клеток *in vitro* в Т-клетках, экспрессирующих CAR, содержащий связывающее средство VH T29D либо связывающее средство VH S55D, по сравнению с исходным связывающим средством VH-034. Примерно $0,2 \times 10^6$ Т-клеток, экспрессирующих CAR, содержащий исходное связывающее средство VH-034, связывающее средство VH T29D или связывающее средство VH S55D, активировали путем добавления $0,1 \times 10^6$ клеток Nalm6 или RAJI, и культуры инкубировали в среде RPMI 1640, дополненной 10% FBS, при 37°C в течение 16 часов. Т-клетки затем анализировали посредством FACS-анализа для количественного определения экспрессии CD25, которая представляет собой маркер активации Т-клеток. Средние геометрические значения интенсивности флуоресценции (gMFI) CD25 в активированных Т-клетках для каждого связывающего средства VH показаны в таблице, проиллюстрированной на фиг. 6.

[196] Как показано в таблице, проиллюстрированной на фиг. 6, связывающие средства для CD19 VH T29D и S55D демонстрировали улучшенную активацию Т-клеток по сравнению с исходным связывающим средством для CD19 VH-034, что указывало на то, что эти замены улучшают активацию Т-клеток клетками, экспрессирующими CD19.

Пример 10. Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащие связывающее средство VH T29D или связывающее средство VH S55, экспрессируют CAR на более высоких уровнях *in vivo*

[197] В данном примере иллюстрируется, что обогащенные связывающие средства VH для CD19 в формате CAR обеспечивают более высокие уровни экспрессии CAR в Т-клетках по сравнению с исходным связывающим средством VH-034.

[198] На фиг. 7 представлена таблица, в которой показано, что обогащенные связывающие средства VH для CD19 в формате CAR обеспечивают более высокие уровни экспрессии CAR в Т-клетках по сравнению с исходным связывающим средством VH-034. Примерно 10×10^6 Т-клеток, экспрессирующих CAR, содержащий исходное связывающее

средство VH-034, связывающее средство VH T29D или связывающее средство VH S55D, вводили мышам (n=5). Спустя 14 дней у обработанных животных отбирали образцы крови, и кровь лизировали с помощью буфера АСК для удаления эритроцитов. Циркулирующие Т-клетки затем анализировали посредством FACS-анализа с гейтированием по CD19+ клеткам, и для каждого образца определяли количество клеток, экспрессирующих CAR. Результаты показаны в таблице, проиллюстрированной на фиг. 7.

[199] Как показано в таблице, проиллюстрированной на фиг. 7, среднее количество CD19-CAR+ циркулирующих Т-клеток было выше для связывающих средств VH T29D и S55D по сравнению с исходным связывающим средством VH-034 на приблизительно 35% и 65% соответственно.

Пример 11. Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащее связывающее средство VH T29D или связывающее средство VH S55D, демонстрируют улучшенное размножение Т-клеток *in vivo*

[200] В данном примере иллюстрируется, что Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающее средство VH T29D или связывающее средство VH S55D, демонстрируют улучшенное размножение Т-клеток *in vivo* по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими CAR, содержащий исходное VH-034.

[201] На фиг. 8 представлена таблица, в которой показано, что Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающее средство VH T29D или связывающее средство VH S55D, демонстрируют улучшенное размножение Т-клеток *in vivo*. NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/Szj) (n=5/группа) вводили 10×10e6 Т-клеток, экспрессирующих CAR, содержащий связывающее средство VH-034 дикого типа, связывающее средство VH T29D или связывающее средство VH S55D. У обработанных мышей отбирали образцы крови в дни 3, 7 и 14, и определяли количество циркулирующих Т-клеток на микролитр крови. Результаты показаны в таблице, проиллюстрированной на фиг. 8.

[202] Как показано в таблице, проиллюстрированной на фиг. 8, кинетика и величина размножения Т-клеток отличаются среди Т-клеток, экспрессирующих исходное связывающее средство VH-034 или любое из двух мутантных связывающих средств VH. Например, Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающее средство VH S55D, демонстрируют отличающуюся кинетику по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими CAR, содержащий связывающее средство VH T29D, в том смысле, что пик размножения Т-клеток с S55D продолжается 3 дня, тогда как пик размножения Т-клеток с T29D продолжается 14 дней. Более того, каждое из двух мутантных связывающих средств VH демонстрировало улучшенную кинетику по сравнению с Т-клетками с исходным VH-034.

Пример 12. Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающее средство VH T29D или связывающее средство VH S55D, демонстрируют уменьшенное истощение Т-клеток *in vivo*

[203] В данном примере иллюстрируется, что Т-клетки, экспрессирующие CAR,

содержащий одно из связывающих средств VH для CD19, обогащенное по связыванию CD19, демонстрируют уменьшенное истощение Т-клеток *in vivo* по сравнению с исходным связывающим средством VH-034.

[204] Примерно 10×10^6 Т-клеток, экспрессирующих исходное связывающее средство VH-034, связывающее средство VH T29D или связывающее средство VH S55D, вводили взрослым мышам NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/Szj) (n=5/группа). Спустя 21 день у обработанных животных отбирали примерно 100 мкл образца крови, и из каждого образца крови удаляли эритроциты с помощью лизирующего буфера АСК. Степень истощения Т-клеток в каждом образце определяли посредством FACS-анализа путем гейтирования по клеткам, экспрессирующим PD-1 или TIGIT-1, которые являются известными маркерами истощения Т-клеток. На фиг. 9 представлена таблица, в которой показано, что Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающее средство для CD19 VH T29D или S55D, демонстрировали меньшее истощение Т-клеток по сравнению с исходным связывающим средством для CD19 VH-034.

[205] Как показано в таблице на фиг. 9, Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающее средство для CD19 VH T29D или S55D, демонстрировали меньшее истощение Т-клеток в день 21, о чем свидетельствует уменьшение количества Т-клеток, экспрессирующих PD-1 или TIGIT, что демонстрирует, что более высокая процентная доля этих клеток остается в неистощенном состоянии по сравнению с исходным связывающим средством для CD19 VH-034.

Пример 13. Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащие связывающее средство VH T29D или связывающее средство VH S55, демонстрируют улучшенную эффективность *in vivo*

[206] В данном примере иллюстрируется, что Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающее средство VH T29D или связывающее средство VH S55D, демонстрируют улучшенную эффективность *in vivo* по сравнению с Т-клетками, экспрессирующими CAR, содержащий исходное связывающее средство VH-034.

[207] В день 0 взрослым самкам мышей NGS (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/Szj) в возрасте шести-семи недель (n=5/группа) внутривенно вводили $0,5 \times 10^6$ клеток RAJI, модифицированных методами генной инженерии для экспрессии люциферазы. В день 5 мышам вводили 10×10^6 Т-клеток, экспрессирующих CAR, содержащий исходное связывающее средство VH-034, связывающее средство VH T29D или связывающее средство VH S55. Мониторинг мышей проводили в течение периода 55 дней.

[208] Биолюминесцентную визуализацию всего тела ("BLI") проводили у анестезированных мышей с недельными интервалами в ходе осуществления исследования для мониторинга прогрессирования опухоли, и цельную кровь собирали у обработанных животных в дни 8, 12, 18, 25, 32, 39 и 55. В день 55 мышей умерщвляли, и их кровь, селезенку и костный мозг из бедренной кости затем собирали для дальнейшего анализа.

[209] На фиг. 10 представлен график с конденсированными данными, на котором показано, что Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающее средство VH

T29D или связывающее средство VH S55D, демонстрировали контроль опухоли. На фиг. 11 представлен график, на котором показаны несконденсированные индивидуальные данные мышинной модели, иллюстрирующие тот же результат, который показан на фиг. 10. Как показано, Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий исходное VH-034, оказывали умеренные эффекты в отношении контроля роста опухоли в ходе осуществления исследования. В отличие от этого, 5/5 мышей, которым вводили Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающее средство VH T29D, демонстрировали полный контроль и регрессию опухоли до дня 55. Аналогичным образом, 3/5, которым вводили Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащий связывающее средство VH S55D, демонстрировали полный контроль и регрессию опухоли до по меньшей мере дня 30. Эти результаты указывают на то, что обогащенные связывающие средства VH для CD19, содержащие мутации T29D и S55D, способствуют наблюдаемой улучшенной эффективности *in vivo* в модели RAJI.

[210] Хотя в данном документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления приведены лишь в качестве примера. Специалистам в данной области техники будут очевидны многочисленные варианты, изменения и замены без отклонения от настоящего изобретения. Следует понимать, что при реализации на практике настоящего изобретения можно использовать различные альтернативы вариантам осуществления настоящего изобретения, описанным в данном документе. Предполагается, что последующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения, и что таким образом охватываются способы и структуры в пределах объема данных пунктов формулы изобретения и их эквивалентов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывается с CD19, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую:

(a) последовательность CDR1, имеющую две или менее замены в SEQ ID NO: 1; и/или

(b) последовательность CDR2, имеющую две или менее замены в SEQ ID NO: 2; и/или

(c) последовательность CDR3, имеющую две или менее замены в любой из SEQ ID NO: 3-4.

2. Антитело по п. 1, где указанные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 присутствуют в каркасной области человеческой VH.

3. Антитело по п. 1, дополнительно содержащее последовательность константной области тяжелой цепи в отсутствие последовательности CH1.

4. Антитело по любому из пп. 1-3, содержащее:

(a) последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 38; и/или

(b) последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 39; и/или

(c) последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-4.

5. Антитело по п. 4, содержащее:

(a) последовательность CDR1, содержащую SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 38; и

(b) последовательность CDR2, содержащую SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 39; и

(c) последовательность CDR3, содержащую SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.

6. Антитело по п. 5, содержащее:

(a) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3; или

(b) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4; или

(c) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 38, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3; или

(d) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 38, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4; или

(e) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 39 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3; или

(f) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 39 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4.

7. Антитело по любому из пп. 1-3, содержащее переменную область тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с любой из последовательностей под SEQ ID NO: 5, 6, 40 и 41.

8. Антитело по п. 7, содержащее последовательность варибельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 40 и 41.

9. Антитело по п. 8, содержащее последовательность варибельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 5.

10. Антитело по п. 8, содержащее последовательность варибельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 6.

11. Антитело по п. 8, содержащее последовательность варибельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 40.

12. Антитело по п. 8, содержащее последовательность варибельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 41.

13. Антитело, которое связывается с CD19, содержащее варибельную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в каркасной области человеческой VH, где последовательности CDR представляют собой последовательности, имеющие две или менее замены в последовательности CDR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 38 и 39.

14. Антитело по п. 13, содержащее варибельную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в каркасной области человеческой VH, где последовательности CDR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 38 и 39.

15. Антитело, которое связывается с CD19, содержащее варибельную область тяжелой цепи, содержащую:

(a) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3 в каркасной области человеческой VH; или

(b) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4 в каркасной области человеческой VH; или

(c) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 38, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3 в каркасной области человеческой VH; или

(d) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 38, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4 в каркасной области человеческой VH; или

(e) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 39 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3 в каркасной области человеческой VH; или

(f) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 39 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4 в каркасной области человеческой VH.

16. Антитело по любому из пп. 1-15, которое является полиспецифическим.

17. Антитело по п. 16, которое является биспецифическим.
18. Антитело по п. 17, которое связывается с двумя разными белками CD19.
19. Антитело по п. 17, которое связывается с двумя разными эпитопами на одном и том же белке CD19.
20. Антитело по п. 16, которое связывается с эффекторной клеткой.
21. Антитело по п. 16, которое связывается с Т-клеточным антигеном.
22. Антитело по п. 21, которое связывается с CD3.
23. Антитело по любому из пп. 1-15, которое представлено в формате CAR-T.
24. CAR-T-клетка, содержащая CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую:
 - (a) последовательность CDR1, содержащую SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 38; и
 - (b) последовательность CDR2, содержащую SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 39; и
 - (c) последовательность CDR3, содержащую SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4.
25. CAR-T-клетка по п. 24, где переменная область тяжелой цепи содержит:
 - (a) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3 в каркасной области человеческой VH; или
 - (b) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4 в каркасной области человеческой VH; или
 - (c) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 38, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3 в каркасной области человеческой VH; или
 - (d) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 38, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 2 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4 в каркасной области человеческой VH; или
 - (e) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 39 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 3 в каркасной области человеческой VH; или
 - (f) последовательность CDR1 под SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 под SEQ ID NO: 39 и последовательность CDR3 под SEQ ID NO: 4 в каркасной области человеческой VH.
26. CAR-T-клетка по п. 24 или п. 25, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, содержит переменную область тяжелой цепи, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с любой из последовательностей под SEQ ID NO: 5, 6, 40 и 41.
27. CAR-T-клетка по п. 26, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, содержит последовательность переменной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 40 и 41.

28. CAR-T-клетка по п. 27, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 5.

29. CAR-T-клетка по п. 27, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 6.

30. CAR-T-клетка по п. 27, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 40.

31. CAR-T-клетка по п. 27, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 41.

32. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-23 или CAR-T-клетку по любому из пп. 24-31.

33. Способ лечения В-клеточного нарушения, характеризующегося экспрессией CD19, включающий введение субъекту с указанным нарушением антитела по любому из пп. 1-23, CAR-T-клетки по любому из пп. 24-31 или фармацевтической композиции по п. 32.

34. Способ по п. 33, где нарушение представляет собой диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL).

35. Способ по п. 33, где нарушение представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ALL).

36. Способ по п. 33, где нарушение представляет собой неходжкинскую лимфому (NHL).

37. Способ по п. 33, где нарушение представляет собой системную красную волчанку (SLE).

38. Способ по п. 33, где нарушение представляет собой ревматоидный артрит (RA).

39. Способ по п. 33, где нарушение представляет собой рассеянный склероз (MS).

40. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп. 1-23 или CAR в CAR-T-клетке по любому из пп. 24-31.

41. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 40.

42. Клетка, содержащая вектор по п. 41.

43. Способ получения антитела по любому из пп. 1-23, при этом способ включает выращивание клетки по п. 42 в условиях, допускающих экспрессию антитела, и выделение антитела из клетки и/или среды для культивирования клеток, в которой выращивают клетку.

44. Способ получения антитела по любому из пп. 1-23, при этом способ включает иммунизацию животного UniRat с помощью CD19 и идентификацию CD19-связывающих последовательностей тяжелой цепи.

45. Способ лечения, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом,

эффективной дозы антитела по любому из пп. 1-23, CAR-T-клетки по любому из пп. 24-31 или фармацевтической композиции по п. 32.

46. Применение антитела по любому из пп. 1-23 или CAR-T-клетки по любому из пп. 24-31 в получении лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом.

47. Антитело по любому из пп. 1-23, CAR-T-клетка по любому из пп. 24-31 или фармацевтическая композиция по п. 32 для применения в терапии у индивидуума, нуждающегося в этом.

48. Набор для лечения заболевания или нарушения у индивидуума, нуждающегося в этом, содержащий антитело по любому из пп. 1-23, CAR-T-клетку по любому из пп. 24-31 или фармацевтическую композицию по п. 32 и инструкции по применению.

49. Набор по п. 48, дополнительно содержащий по меньшей мере один дополнительный реагент.

50. Набор по п. 49, где по меньшей мере один дополнительный реагент содержит химиотерапевтическое лекарственное средство.

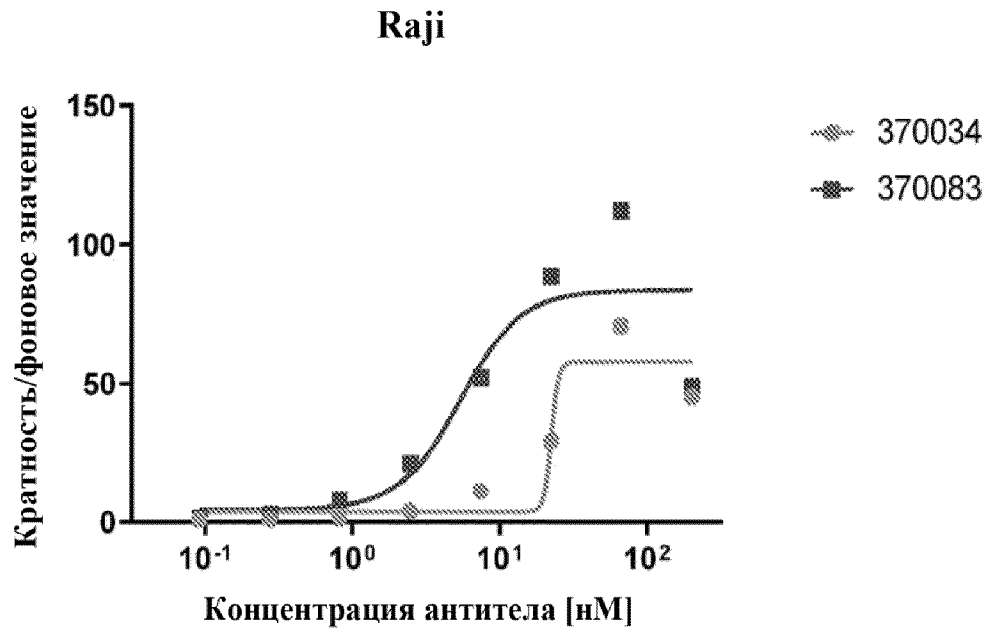
По доверенности

ФИГ. 1

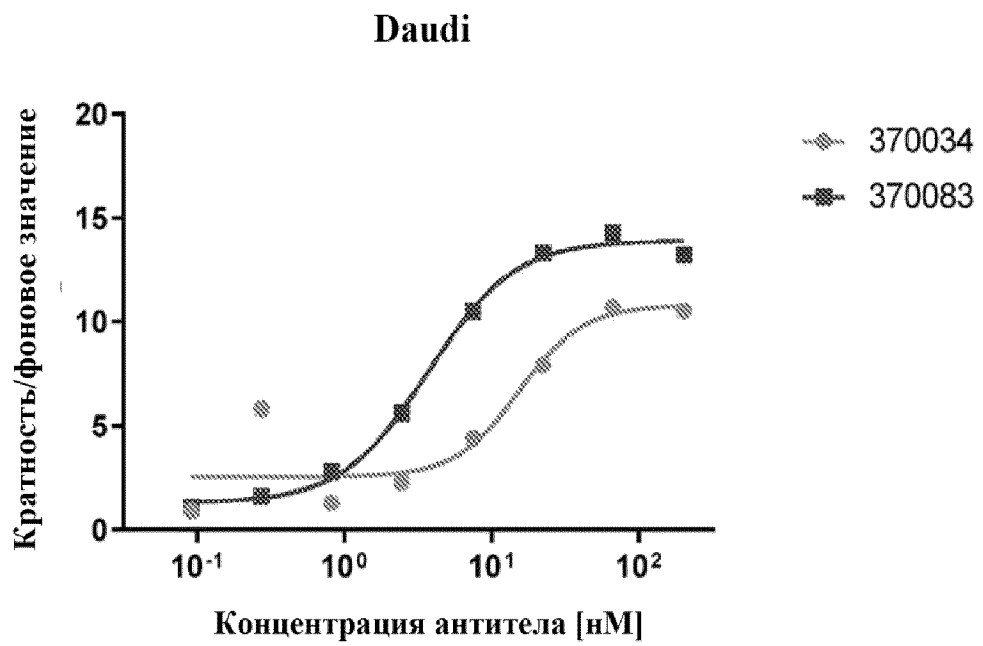
Столбец 1	Столбец 2	Столбец 3
ID клона	Клетки Raji	Нецелевые СНО
370083	120,5	1,0
370034	80,3	1,0

ФИГ. 2

А.



В.

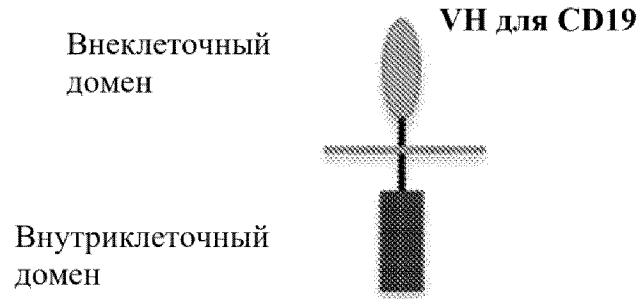


ФИГ. 3

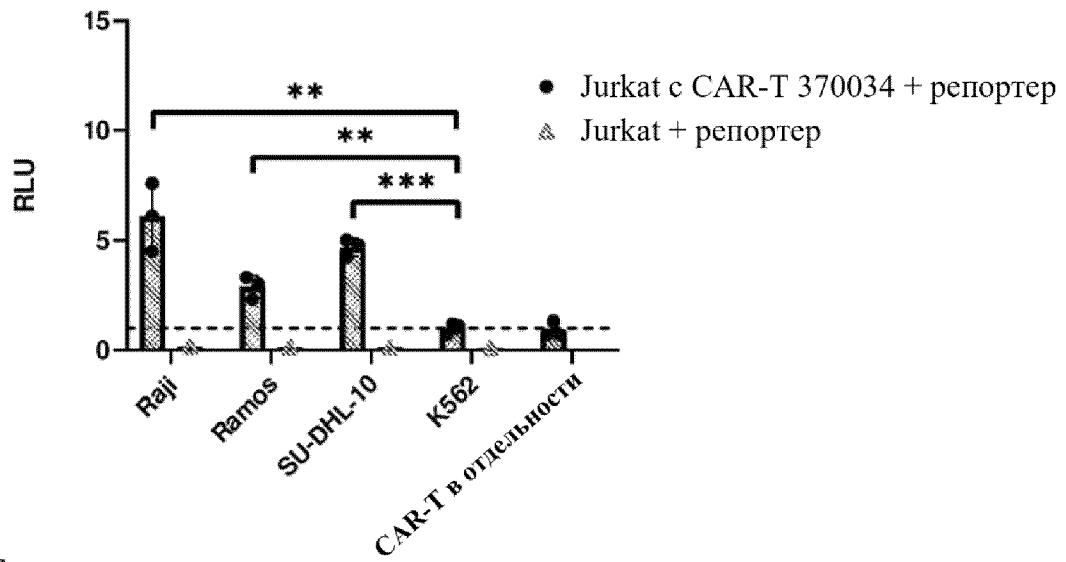
Столбец 1	Столбец 2	Столбец 3
ID клона	Клетки Raji	Клетки Daudi
370083	5,361	3,723
370034	22,36	15,42

ФИГ. 4

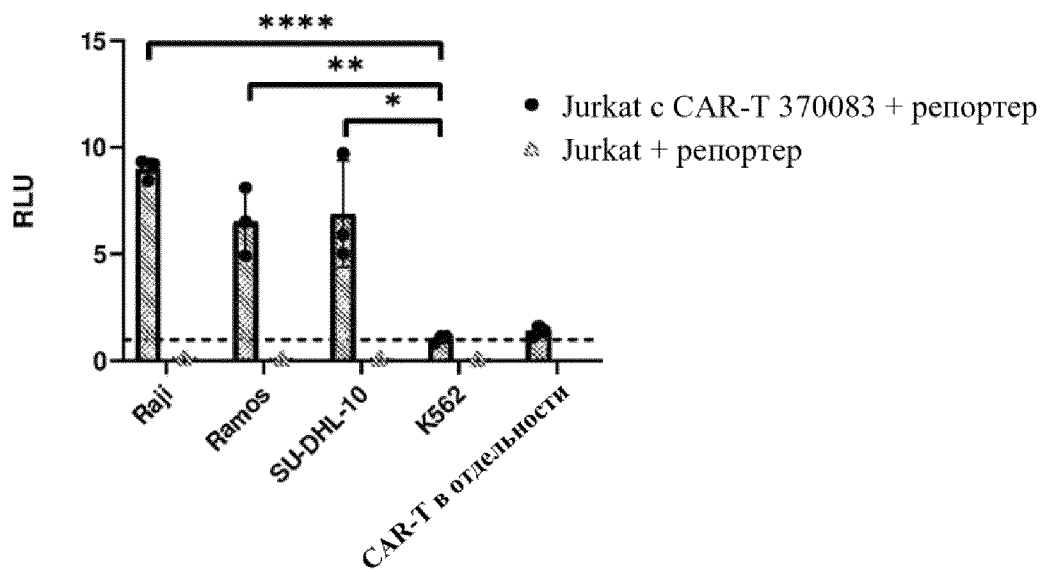
А.



В.

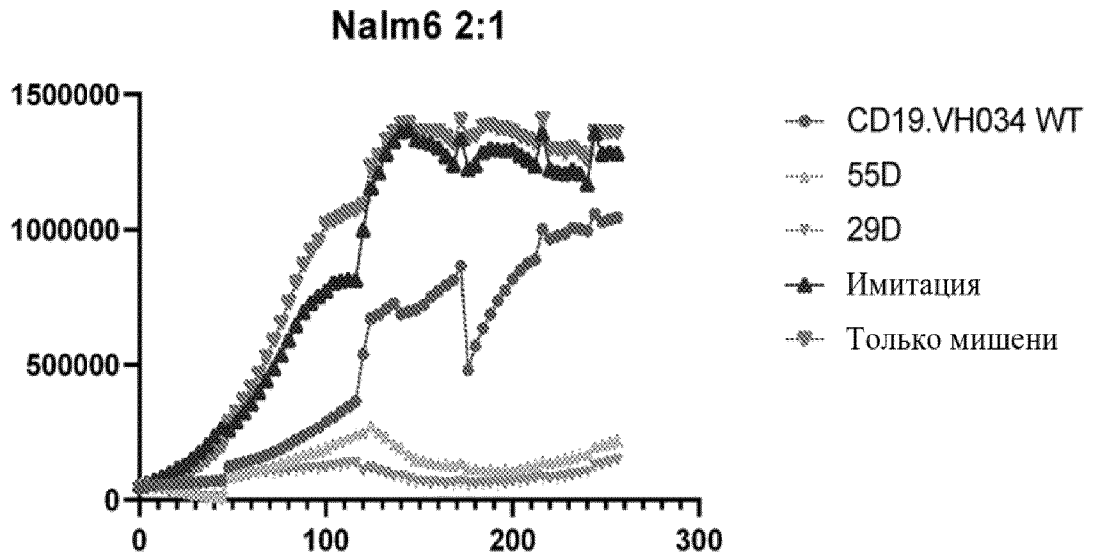


С.

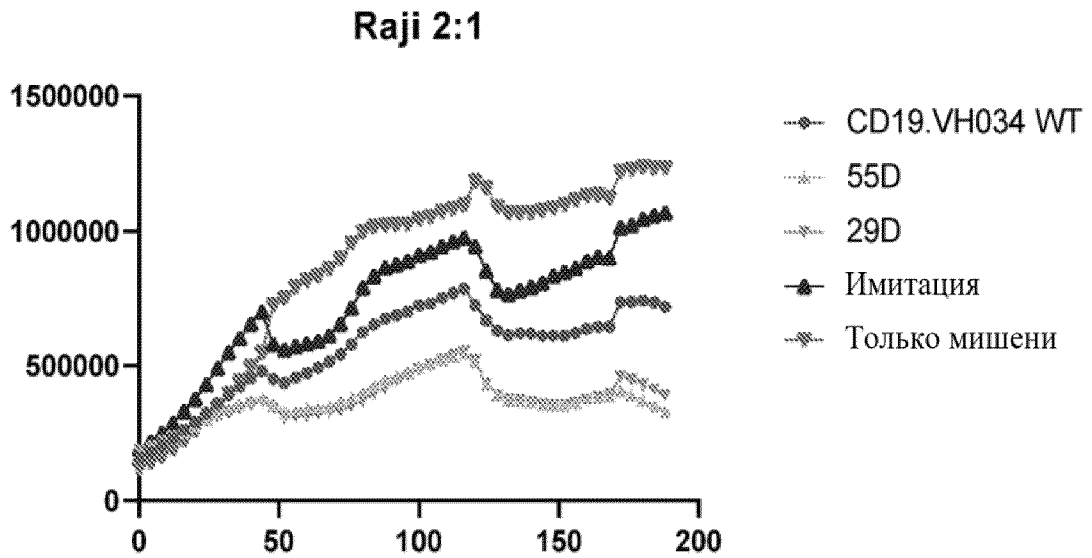


ФИГ. 5

A.



B.



ФИГ. 6

gMFI CD25	Только Т- клетки	Клетки RAJI	Клетки Nalm6
VH-034	642	1497	921
T29D	531	2562	1285
S55D	560	2091	1169

ФИГ. 7

Связывающее средство VH	% экспрессии CAR (день 14)
Неспецифическое Т-клеточное (отриц.)	4,4
VH-034	22,9
T29D	30,9
S55D	37,7

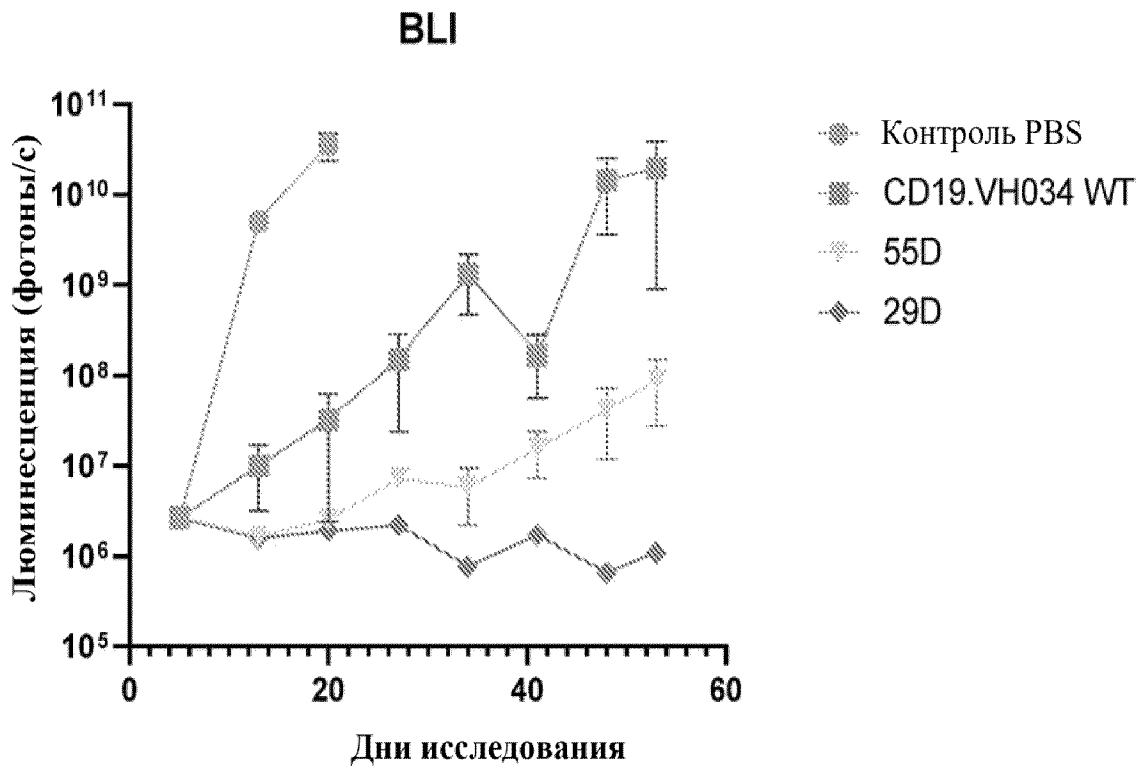
ФИГ. 8

Связывающее средство VH, № мышь	День 3	День 7	День 14
VH-034 M1	2,7	7,2	2,9
VH-034 M2	0,9	9,1	1,9
VH-034 M3	4,6	17,1	3,7
VH-034 M4	15,0	19,5	21,1
VH-034 M5	3,7	18,3	0
VH T29D M1	27,0	45,7	74,0
VH T29D M2	67,1	26,1	105,4
VH T29D M3	37,4	48,5	14,4
VH T29D M4	63,6	26,2	39,2
VH-T29D M5	77,7	44,6	109,0
VH S55D M1	78,7	102,4	81,1
VH S55D M2	28,9	64,4	14,4
VH S55D M3	34,4	74,0	24,0
VH S55D M4	33,0	55,0	18,1
VH-S55D M5	41,7	78,6	35,7

ФИГ. 9

Связывающее средство VH для CD19	PD-1 (gMFI)	TIGIT (gMFI)
VH-034	65,2	141
T29D	27,2	99
S55D	10,6	68

ФИГ. 10



ФИГ. 11

